

(19)



REPUBLIKA SLOVENIJA
Urad RS za intelektualno lastnino

(10) **SI 8212812 A8**

(12)

PRENEŠENI PATENT

(21) Številka prijave: **8212812**

(22) Datum prijave: **20.12.1982**

(51) MPK⁶: **C12P 1/04**, C12N 1/20,
C12N 9/14, C12N 9/50,
C12N 9/52

(60) Patent pri ZZZP: **YU 2812/82, 20.12.1982 (31.12.1984)**
YU 43107

(45) Datum objave: **31.10.1995**

(30) Prednost: **22.12.1981 DK 5690/81;**
06.05.1982 DK 2025/82

(72) Izumitelj: **ADLER-NISSEN LORENZ, Gentofte, DK;**
JENSEN GEORG WILHELM, Bagsvaerd, DK;
RIISGAARD STEEN, Tokyo, JP;
GUERTLER HENRIK, Lyngby, DK;
OLSEN SEJR HANS AAGE, Vanløese, DK;
SCHUELEIN MARTIN, Koebenhavn, DK

(73) Nosilec: **NOVO INDUSTRI A/S Novo Alle, 2880 Bagsvaerd, DK**

(74) Zastopnik: **PATENTNA PISARNA D.O.O., Čopova 14 p.p. 322, 61000 Ljubljana, SI**

(54) **IZBOLJŠAVE PRI ENCIMU ZA RAZGRADNJO VISOKOMOLEKULSKEGA OGLJIKOVEGA HIDRATA IN V ZVEZI Z NJIM, IZOLIRANI VISOKOMOLEKULSKI OGLJIKOV HIDRAT, POSTOPEK ZA IZBIRO MIKROORGANIZMA, KI PROIZVAJA TAK ENCIM, IN POSTOPEK ZA PROIZVODNJO TAKEGA ENCIMA**

SI 8212812 A8

Novo Industri A/S

SFS-aza 2390

Izboljšave pri encimu za razgradnjo visokomolekulskega ogljikovega hidrata in v zvezi z njim, izolirani visokomolekulski ogljikov hidrat, postopek za izbiro mikroorganizam, ki proizvaja tak encim, in postopek za proizvodnjo takega encima.

V belgijskem patentu št. 882.769 je opisan postopek za proizvodnjo očiščenega rastlinskega proteinskega produkta (p.v.p. , purified vegetable protein product) z encimskim odstranjevanjem preostanka brez raztapljanja in ponovnega obarjanja proteina. Čistota pvp, ki se ga da dobiti po znanem

postopku, ni zadovoljiva, zato bi se dala izboljšati. V primerih je dokazana čistota pvp okoli 85 %. Celo če je možno dobiti z znanim postopkom pvp s čistoto okoli 90 %, je to možno doseči samo z določenimi predhodno obdelanimi izhodnimi materiali, npr. s sojinim proteinskim koncentratom. Zaželeno bi bilo, da bi se dalo doseči čistoto pvp okoli ali nad 90 % z mnogo širšim spektrumom izhodnih materialov, zlasti moke iz luščene in razmaščene soje.

Izum temelji na presenetljivi ugotovitvi, da se določen del razgradnega produkta preostanka, kot se pojavlja pri zgoraj navedeni encimski obdelavi, to je vodotopni, visokomolekulski ogljikovhidrat, veže na del rastlinskega proteina, kot bomo kasneje podrobno pojasnili. To ima seveda za posledico manjšo čistoto proteina. Ugotovili smo tudi, da ima ta visokomolekulski ogljikovhidrat sposobnost, da se veže na proteine živalskega porekla.

Tako je smoter izuma zagotoviti encim za razgradnjo zgoraj navedenega visokomolekulskega ogljikovega hidrata, ki bo omogočil proizvodnjo pvp z izboljšano čistoto, in postopek za proizvodnjo takega encima.

Osnovo za izum lahko opišemo na sledeči način, pri čemer se sklicujemo na sliko 1, na kateri je prikazan samo material, ki obstoji iz neraztopljenih trdnih snovi, medtem ko so vsi supernatanti izpuščeni. Šaržo sojine moke smo razdelili v dva dela, del I in del II (stolpec a na sliki 1).

Del I smo proteolitsko razgradili pri pH vrednosti okoli 8 s pomočjo ALCALASE (proteolitski encim, proizveden s pomočjo *B.licheniformis*, ki ga prodaja NOVO INDUSTRI A/S, 2880 Bagsvaerd, Danska) in nato še izpirali pri pH okoli 8, da smo odstranili celotno količino proteina; preostanek smo ločili od supernatanta in sprali (glej del I, stolpec a in b, sl. 1). Na ta način smo izolirali čist preostanek (imenovan preostanek I) (stolpec b na sl. 1). Dela II sojine moke nismo obdelali; zaradi jedrnatosti imenujemo preostanek v delu II preostanek II (stolpec b na sl. 1). Sedaj razgradimo tako preostanek I kot del II s pomočjo tržne pektinaze, npr. PECTINEXA (pektolitični encim, ki ga proizvaja Schweizerische Ferment A/G, Basel, Švica) (glej stolpec b in c na sl. 1). Presenetljivo smo ugotovili, da je neraztopljeni del preostanka I mnogo manjši, kot neraztopljeni del preostanka II, na osnovi masnih bilanc dušika in suhe snovi, glej sl. 1, kjer črtkana področja v stolpcu c ustrezajo netopnim neproteinskim materialom v zgoraj navedeni stopnji. Nadalje, če spravimo supernatant preostanka I, obdelanega s pektinazo, pri pH 4,5 v stik s suspenzijo sojinega proteina, se polisaharid v supernatantu veže na sojin protein. Ta polisaharid v supernatantu preostanka I, ki je del razgradnega produkta preostanka in ki se v odsotnosti sojinega proteina v vodi bistro topi, vendar pa veže na sojin protein pri izoelektrični točki sojinega proteina ali okoli nje, če je sojin protein prisoten, imenujemo SPS (Soluble Polysaccharide), glej sl. 1. SPS ima porazdelitev molekulske mase med 5×10^6

in $4,9 \times 10^4$. Proizvodnja izoliranega SPS je razvidna iz tehnološke sheme na sl. 2, ki obsega tudi nekatere od procesov, prikazanih na sl. 1. Zato je problem, najti encim, ki je sposoben razgraditi SPS na tak način, da razgradni produkti SPS ne vežejo sojinega proteina ali da vežejo sojin protein pod mnogo manjši meri kot veže sojin protein SPS.

Čeprav se opis izrecno nanaša na sojin protein, pa izum ni omejen na sojin protein, temveč obsega vse vrste rastlinskih proteinov, glej npr. proteine, navedene v belgijskem patentu št. 882.769, str. 1.

Sedaj smo v skladu z izumom ugotovili, da lahko s selekcioniranjem sposobnosti za razgradnjo sojinega SPS izberemo mikroorganizme, ki so sposobni, da proizvedejo spojino, ki kaže encimsko aktivnost, ki učinkovito razgrajuje sojin SPS, in ki jo v nadaljevanju zaradi jedrnatosti imenujemo SPS-aza.

Tako obsega prvi vidik izuma SPS-azo, karbohidrazo v uporabni obliki, ki je sposobna, da razgradi pod primernimi pogoji sojin SPS v razgradne produkte, ki se vežejo na protein v vodnem mediju v manjši meri, kot bi se sojin SPS pred razgradnjo sam vezal na isti protein pod ustreznimi pogoji.

Nadalje smo ugotovili, da je ta SPS-aza, ki je sposobna, da razgradi sojin SPS, sposobna, da razgradi polisaharide, ki so podobni SPS, in ki izvirajo iz sočivja in plodov, popolneje kdor tržne pektinaze in tržne celulaze.

Zgoraj navedeni izraz "v uporabni obliki" je mišljen tako, da izključuje iz izuma npr. pripravek, ki vsebuje SPS-azo, ki vsebuje toksične snovi ali ki kaže tako majhno aktivnost SPS-aze, da zahteva uporabo pripravka, ki vsebuje več kot 10 % SPS-aze glede na težo SPS v substratu, pri presnovi, ki jo izvajamo 24 ur in pri 50°C in pH-optimumu omenjene SPS-aze, da dosežemo kakršnokoli praktično pomembno razgradnjo SPS.

S popolnim ali delnim odstranjenjem SPS iz končnega rastlinskega proteina se čistota končnega rastlinskega proteina v primerjavi s čistoto končnega rastlinskega proteina, ki se ga da dobiti v skladu s postopkom, znanim iz belgijskega patenta št. 882.769, nujno izboljša, saj je bil ta znani rastlinski proteinski produkt onečiščen z SPS.

Trenutno ni znano, ali izvira encimska aktivnost posamezne SPS-aze, opisane v nadaljevanju, iz enega samega encima ali iz encimskega kompleksa, ki obsega vsaj dva encima.

Kot se zdi, kažejo nekatere raziskave namreč, da sta za razgradni učinek SPS-aze odgovorna vsaj dva encima, pri čemer je eden od obeh encimov sposoben, da izvede samo rahlo razgradnjo SPS, nakar je eden ali več encimov sposobnih, da izvedejo bolj obsežno razgradnjo SPS. Vendar prijaviteljica ne želi, da bi jo taka hipoteza ali podobne hipoteze omejevale.

Frednostna oblika SPS-aze v smislu izuma je označena s tem, da je SPS-aza sposobna, da razgradi sojin SPS v vodnem

mediju v razgradne produkte, ki se vežejo na rastlinski protein v vodnem mediju v manjši meri, kot bi se sojin SPS pred razgradnjo vezal sam na isti rastlinski protein v vodnem mediju.

Frednostna oblika SPS-aze v smislu izuma je označena s tem, da je SPS-aza sposobna, da razgradi sojin SPS v vodnem mediju s pH vrednostjo, ki od 4,5 ne odstopa za več kot 1,5, v razgradne produkte, ki se vežejo na sojin protein v vodnem mediju v manjši meri, kot bi se sojin SPS pred razgradnjo vezal ~~same~~ na sojin protein v vodnem mediju.

Frednostna oblika SPS-aze v smislu izuma je označena s tem, da se razgradni produkti sojinega SPS po končani razgradnji vežejo na rastlinski protein v obsegu manj kot 50 %, zlasti manj kot 20 %, kot bi se sojin SPS pred razgradnjo vezal na rastlinski protein v vodnem mediju.

Frednostna oblika SPS-aze v smislu izuma je označena s tem, da kaže SPS-aza pozitiven test na SPS-azo, če jo preiskujemo v skladu z metodo za kvalitativno in kvantitativno določitev SPS-aze, opisano v tem opisu.

Frednostna oblika SPS-aze v smislu izuma je označena s tem, da smo SPS-azo proizvedli s pomočjo mikroorganizma, ki spada v rod *Aspergillus*, prednostno v skupino *Aspergillus niger*.

Frednostna oblika SPS-aze v smislu izuma je označena s tem, da je SPS-aza izvedena iz encimov, ki se jih da proiz-

vesti s pomočjo *Asp. aculeatus* CBS 101.43. Isto SPS-azo lahko proizvedemo s pomočjo *Asp. japonicus* IFO 4408. Ugotovili smo, da proizvaja *Asp. aculeatus* CBS 101.43 tudi zelo učinkovite remanaze, celulaze, pektinaze in hemicelulaze. Nadalje smo ugotovili, da ne proizvaja prav vsak sev, ki spada k species *Asp. aculeatus* ali *Asp. japonicus*, SPS-aze, ki je potrebna za izum. Tako smo dokazali, kot je razvidno kasneje v opisu (poglavje 5), da sev *Asp. japonicus* ATCC 20236 ne proizvaja takih količin SPS-aze, da bi se jih dalo ugotoviti s pomočjo encimske določitve SPS-aze, opisane v tem opisu.

Prednostna oblika SPS-aze v smislu izuma je označena s tem, da je SPS-aza imunoelektroforetično identična SPS-azi, ki se jo da proizvesti s pomočjo *Asp. aculeatus* CBS 101.43, in identificirati s pomočjo imunoelektroforetične prekrivne tehnike, glej poglavje 6 in 7.

Če proizvodimo SPS-azo mikrobnno, se tvori v zmesi z več spremljajočimi snovmi, zlasti drugimi encimi. Po želji lahko omenjeno SPS-azo očistimo, če npr. s pomočjo kromatografskih ločilnih metod, kot bo razvidno kasneje v tem opisu (poglavje 8).

V *Agr.Biol.Chem* 40 (1), 87 do 92, 1976 je opisano, da sev *Asp. japonicus* ATCC 20236 proizvaja encimski kompleks, ki je sposoben, da izvede delno degradacijo kislinskega polisaharida v sojini omaki, imenovanega APS, katerega del imenujejo

APS-I. Ta kislinski polisaharid ni identičen z SPS, kot bomo podrobneje prikazali v tem opisu kasneje v poglavju 3. Tako sta HPLC (visokotlačna tekočinska kromatografija) kromatograma gelske filtracije SPS in APS očitno različna in poleg tega sta kromatograma gelske filtracije APS, razgrajenega s pomočjo tržne pektinaze Pectolyase, in SPS, obdelanega s tržno pektinazo Pectolyaso, očitno različna. Poleg tega iz članka ni razvidno, da je kislinski polisaharid vezan na sojin protein in da razgrajeni kislinski polisaharid ni vezan na sojin protein ali da je vezan na sojin protein v mnogo manjši meri, kot nerazgrajeni kislinski polisaharid. Dokazano je bilo tudi, da ta sev ne tvori SPS-aze v takih količinah, ki bi jih lahko ugotovili s pomočjo encimske določitve SPS-aze, opisane v tem opisu. To je ustvarilo predsodek, da noben sev *Asp. japonicus* ne proizvaja SPS-aze, v skladu z izumom pa smo presenetljivo ugotovili, da nekateri sevi *Asp. japonicus* proizvajajo SPS-azo.

Drugi vidik izuma obsega izolirani SPS, proizveden na osnovi rastlinskega surovega proteina kot izhodnega materiala.

Prednostna oblika izoliranega SPS v smislu izuma je označena s tem, da je rastlinski surovi protein razmaščena sojina moka. Proizvodnja tega izoliranega SPS je opisana spodaj v zvezi s sl. 2.

Tretji vidik izuma obsega postopek za izbiro mikroorganizma, ki proizvaja SPS-azo, za proizvodnjo SPS-aze v

skladu z izumom, ki je označen s tem, da gojimo mikroorganizem, ki ga hočemo testirati, na gojišču, katerega glavni vir ogljika je SPS, nakar vzorec gojišča analiziramo na SPS-azo, in če je analiza na SPS-azo pozitivna, omenjeni mikroorganizem izberemo kot mikroorganizem, ki proizvaja SPS-azo.

Četrty vidik izuma je postopek za proizvodnjo SPS-aze, ki je označen s tem, da sev, ki se ga da izbrati v skladu z gornjim postopkom za izbiro mikroorganizma, ki proizvaja SPS-azo, gojimo na gojišču. Gojenje lahko izvedemo kot submerzno fermentacijo ali kot površinsko fermentacijo.

Prednostna oblika postopka v smislu izuma je označena s tem, da gojimo na gojišču *ves* *Asp. aculeatus* CBS 101.43 ali *Asp. japonicus* IFO 4408.

Prednostna oblika postopka v smislu izuma je označena s tem, da izvedemo gojenje kot submerzno gojenje pri pH v območju 3 do 7, prednostno od 4 do 6, pri temperaturi v območju od 20 do 40°C, prednostno od 25 do 35°C, pri čemer vsebuje gojišče vir ogljika in dušike in anorganske soli.

Prednostna oblika postopka v smislu izuma je označena s tem, da vsebuje gojišče praženo sojino moko.

Prednostna oblika postopka v smislu izuma je označena s tem, da obdelamo sojino moko, predno jo uporabimo kot sestavino substrata, s proteolitskim encimom, prednostno s proteolitskim encimom, proizvedenim mikrobno s pomočjo *Bacillus licheniformis*.

Prednostna oblika postopka v smislu izuma je označena s tem, da fermentacijski brozgi med gojenjem aseptično dodamo raztopino pektina.

Ugotovili smo, da proizvaja *Asp. aculeatus* CBS 101.43 poleg SPS-aze tudi zelo učinkovite encime, ki solubilizirajo preostanek, celulaze, pektinaze in hemicelulaze, in da je encimski kompleks, proizveden s pomočjo *Asp. aculeatus* CBS 101.43, nadvse primeren kot sredstvo za uporabo pri razkroju celičnih sten rastlinskih materialov. Tako lahko encimski kompleks, ki se ga da proizvesti z *Asp. aculeatus* CBS 101.43, uporabimo z odličnimi rezultati v živilski predelovalni industriji za obdelavo sadnih in zelenjavnih kaš in za namene bistrenja in zmanjšanja viskoznosti pri predelavi sokov in vina; uporabimo ga lahko tudi kot dehidrationsko sredstvo (to je sredstvo za razgradnjo polisaharidov in torej za sproščanje vode, vezane v polimerni strukturi polisaharidov) pri predelavi rastlinske hrane.

Peti vidik izuma obsega uporabo SPS-aze ali postopek za razgradnjo polisaharidov, prednostno polisaharidov rastlinskih celičnih sten, s pomočjo karbohidraze, ki je označen s tem, da spravimo pripravek SPS-aze v smislu izuma v vodnem mediju v stik s substratom za ta pripravek SPS-aze.

Tako smo v skladu z izumom ugotovili, da so pripravki SPS-aze dragoceni encimski pripravki za delno ali popolno

utekočinjenje ali razgradnjo različnih materialov, prednostno rastlinskih materialov, npr. sadja, in rastlinskih odpadkov, ki vsebujejo protein, celulozo, hemicelulozo (npr. glukane, ksilane, galaktane in araban), gumije, pektin, lipide, inulin, polifenole, škrob in alginat, ali za sorodne namene, glej tabelo, prikazano kasneje v opisu. Kot primere takih sorodnih namenov lahko omenimo vse namene, za katere uporabljamo danes tržne pektinaze in celulaze. Kasneje bomo navedli v tem opisu več primerov.

V zvezi s postopkom ekstrakcije (izolacije), opisanim npr. v primeru 2, pripominjamo, da je pripravek SPS-aze v bistvu brez proteinaze zaradi dejstva, ker bi se sicer zeleni končni produkt, torej protein, razgradil. Podobno mora biti uporabljeni pripravek SPS-aze, če hočemo ekstrahirati (izolirati) iz surovega biološkega materiala biološke materiale, ki niso protein, v bistvu brez vsakega encima, ki razgradi ta drugi biološki material. Take modificirane pripravke SPS-aze lahko proizvedemo s selektivno inaktivacijo nezaželenega encima s frakcioniranjem ali drugimi, samimi po sebi znanimi metodami.

Tako je prednostna oblika uporabe v smislu izuma označena s tem, da spremlja razgradnjo izolacija ali ekstrakcija biološkega materiala, ki ni sojin protein in sorodni rastlinski proteini iz surovih bioloških materialov, pri čemer pripravek SPS-aze ne vsebuje v bistvu nobenega encima, ki je

sposoben, da razgradi ta biološki material.

Tako smo v skladu z izumom ugotovili, da so modificirani pripravki SPS-aze (modificirani v tem smislu, da v bistvu ne vsebujejo encimov, ki so sposobni, da razgradijo biološki material, ki ga je treba ekstrahirati ali izolirati) dragoceni encimski pripravki za ekstrakcijo (izolacijo) navedenih bioloških materialov, npr. škroba, lipidov, arom, barvil in sokov, iz surovih bioloških materialov. Kasneje bomo navedli v tem opisu več primerov.

Prednostna oblika uporabe v skladu z izumom je označena s tem, da nadalje obdelamo enega ali več reakcijskih produktov (ne glede na to, ali so zaželeni končni produkti ali odpadni produkti) istočasno z encimsko obdelavo ali po njej. S tem je zagotovljena prožnejša in prilagodljivejša uporaba.

Prednostna oblika uporabe v skladu z izumom je označena s tem, da je nadaljnja obdelava v primeru, da je eden od reakcijskih produktov fermentabilen sladkor, alkoholna fermentacija. S tem je zagotovljen enostaven in cenen postopek za proizvodnjo alkohola.

tele

Da bi pojasnili naravo izuma, se sklicujemo na sledeča poglavja 1 do 10, ki vsa opisujejo podrobnosti v zvezi z izumom.

1. Proizvodnja SPS.
2. ~~K~~Karakterizacija SPS, zlasti njegova porazdelitev molekulske mase.
3. Dokumentacija ~~za dejstvo~~, da sta SPS in APS različni spojini.
4. Selekcioniranje mikroorganizmov, ki proizvajajo SPS-azo.
5. Karakterizacija nekaterih mikroorganizmov, ki tvorijo SPS-azo.
6. Splošni opis prekrivne tehnike, povezane z imuno-elektroforezo.
7. Imunoelektroforetična karakterizacija SPS-aze s polispecifičnim protitelesom in prekritjem.
8. Čiščenje pripravka SPS-aze.
9. Odvisnost aktivnosti od pH, odvisnost aktivnosti od temperature in stabilnost SPS-aze.
10. Določitve encimske aktivnosti.

POGLAVJE 1

PROIZVODNJA SPS

Kot smo že prej omenili, je lahko izhodni material za proizvodnjo SPS sojin preostanek. Zato opisujemo najprej proizvodnjo sojnega preostanka.

Sojin preostanek je brezproteinska ogljikohidratna frakcija (ki lahko v praksi vsebuje manjše količine lignina in mineralov) v moki iz razmaščene in luščene soje; ta ogljikohidratna frakcija je v vodnem mediju s pH 4,5 netopna in jo lahko proizvedemo na sledeči način, pri čemer se sklicujemo tudi na tehnološko shemo 1.

Razmaščeno sojino moko (Sojamel 13, proizvajalec Aarhus Oliefabrik A/S) suspendiramo v deionizirani vodi s 50°C v masnem razmerju sojina moka:voda = 1:5 v posodi s pH-statom in kontrolo temperature. pH uravnamo s 4 N NaOH na 8,0 (I). Sedaj izvedemo pH-statsko hidrolizo z ALCALASE 0,6 L (proteolitskim encimom na osnovi B. licheniformis z aktivnostjo 0,6 Ansonovih enot/g, pri čemer določimo aktivnost v skladu z Ansonovo metodo, kot je opisana v NOVO ENZYME INFORMATION IB No. 058 e-GB), pri čemer je razmerje encim/substrat enako 4 % količine proteina v sojini moki (II). Po 1 uri hidrolize goščo ločimo s centrifugiranjem (III) in spiranjem (IV), pri čemer izvedemo to operacijo dvakrat (V, VI, VII). Tako obdelano goščo ponovno hidroliziramo 1 uro z ALCALASE 0,6 L (VIII, IX),

podobno, kot smo navedli prej. Nato goščo ločimo s centrifugiranjem (X) in jo dvakrat speremo (XI, XII, XIII, XIV), pri čemer končno sprano goščo (6) razpršilno posušimo (XV). Tako proizvedeni razpršilno sušeni prah je sojin preostanek, ki služi kot surovina za proizvodnjo SPS.

SPS je v vodi topna polisaharidna frakcija, ki se tvori z običajno obdelavo zgoraj navedenega sojinega preostanka s pektinazo. SPS proizvedemo na sledeči način s pomočjo spodaj navedenih 14 reakcijskih stopenj, pri čemer se sklicujemo tudi na tehnološko shemo 2.

1. Določimo delež suhe snovi v zgoraj omenjenem sojinem preostanku in sojin preostanek razredčimo z vodo na 2 % suhe snovi in vzdržujemo v suspenziji pri 50^oC v posodi s kontrolo temperature.
2. pH vrednost uravnamo s 6 N NaOH na 4,50.
3. Dodamo Pectinex Super conc. L v količini 200 g/kg suhe snovi (tržna pektinaza, proizvajalec Schweizerische Ferment AG, Basel, Švica, s pektinazno aktivnostjo 75 750.000 MOU, določeno v skladu s prospektom "Determination of the Pectinase units on Apple Juice (MOU)" z dne 12.6.1981, ki se ga da dobiti od Schweizerische Ferment AG, Bazel, Švica), in dodamo tudi Celluclast 200 L v količini 20 g/kg suhe snovi (tržna celulaza, opisana v

prospektu NOVO enzymes, information sheet B 153 e-GB
1000 July, 1981, ki se da dobiti od NOVO INDUSTRI A/S,
Novo Alle, 2880 Bagsværd, Danska).

4. Vsebino posode vzdržujemo med mešanjem 24 ur pri 50°C.
5. Encime inaktiviramo s tem, da zvišamo pH vrednost s 4 N NaOH na 9,0. Reakcijsko zmes vzdržujemo 30 minut in pH vrednost nato ponovno uravnamo s 6 N HCl na 4,5.
6. Reakcijsko zmes centrifugiramo in zberemo tako centrifugat kot goščo.
7. Centrifugat iz stopnje 6 kontrolno filtriramo na filtrski stiskalnici (filter pred kontrolno filtracijo speremo z vodo).
8. Kontrolni filtrat ultrafiltriramo, diafiltriramo in ponovno ultrafiltriramo na membrani z mejno vrednostjo 30.000 (DDS GR 60-P firme De Danske Sukkerfabrikker), pri čemer uporabljamo sledeče parametre:
 1. Ultrafiltracija, ki ustreza šestkratni koncentraciji volumna.
 2. Diafiltracija, dokler odstotek suhe snovi v permeatu ni 0 (~ 0° Brix).
 3. Ultrafiltracija do okoli 15 % suhe snovi v koncentratu.

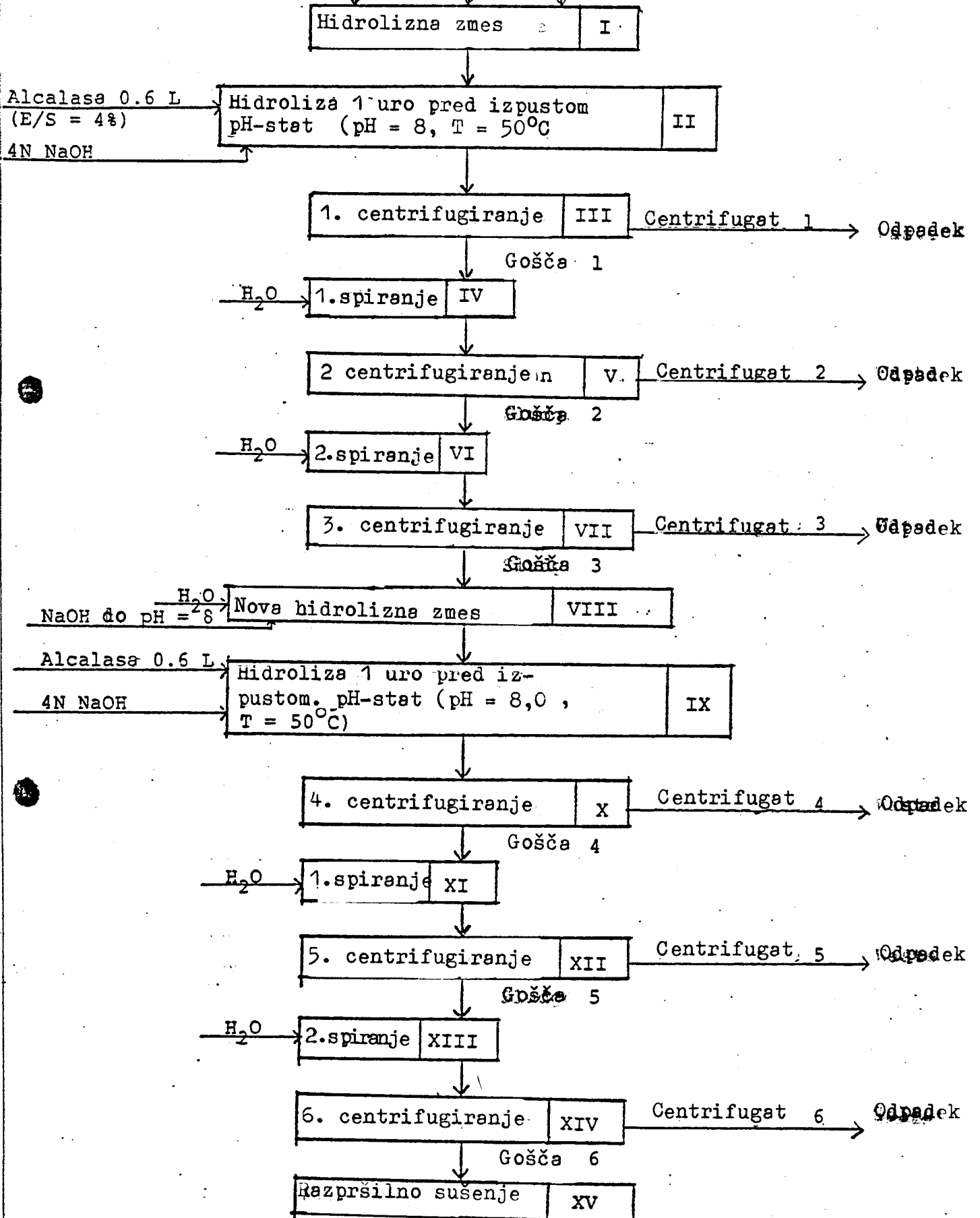
Temperatura je 50°C, pH je 4,5 in povprečni tlak je 3 bare.

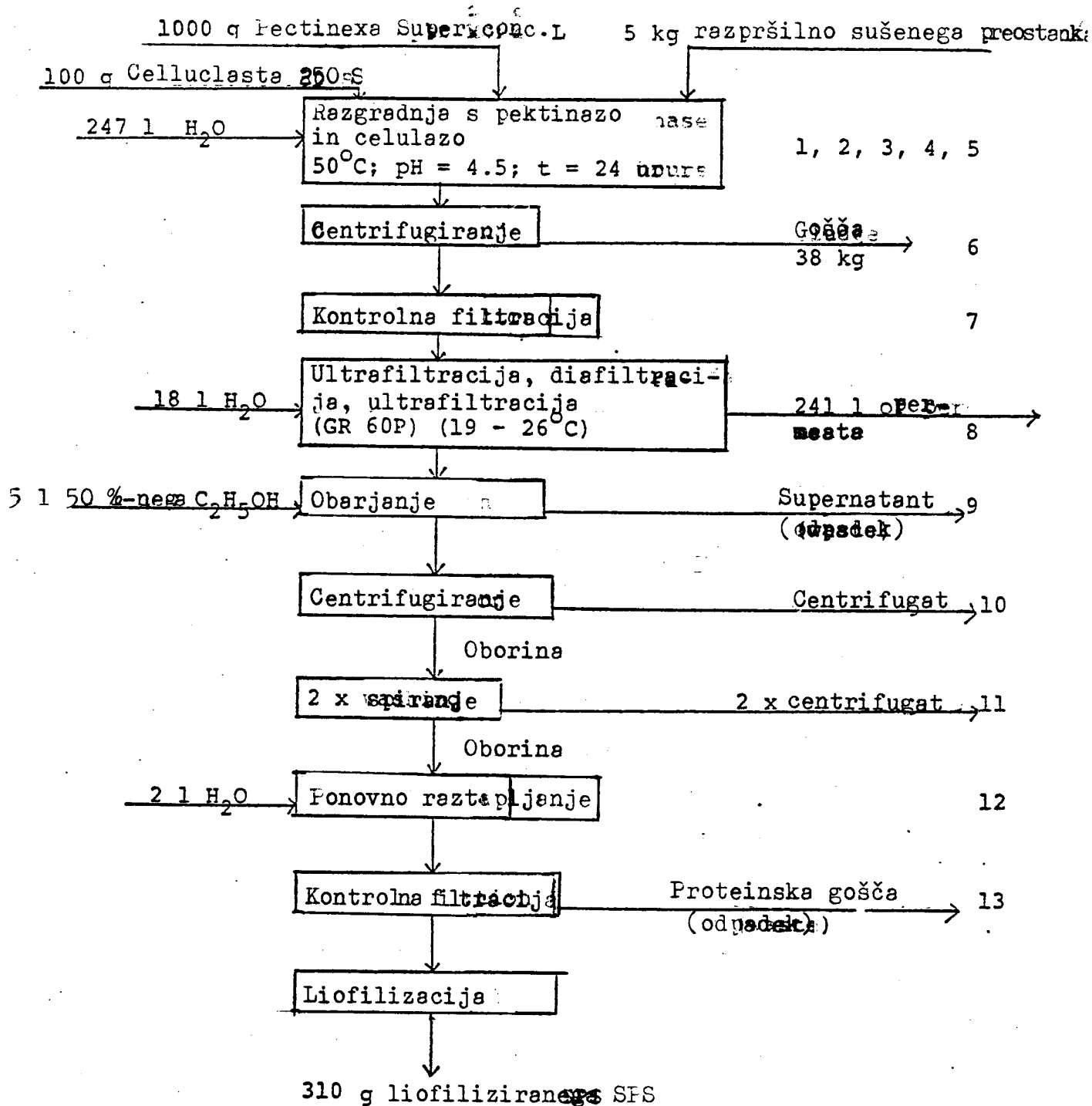
9. Ultrafiltrirani koncentrat ohladimo na 5°C in dodamo enak volumen 96 %-nega etanola.
10. Oborino zberemo s pomočjo centrifuge.
11. ~~Oborino~~ speremo dvakrat s 50 % v/v etanola v H₂O, kar ustreza volumnu centrifugata iz stopnje 10, to je, izvedemo dve centrifugiranji.
12. Sprano oborino ponovno raztopimo v vodi z volumnom, ki je enak volumnu ultrafiltriranega koncentrata iz stopnje 9.
13. Tekočino iz stopnje 12 kontrolno filtriramo na steklenem filtru.
14. Bistri filtrat, ki vsebuje čisti SPS, liofiliziramo.

25. 11. 97

TEHNOLOŠKA SHEMA 01.1.

razmaščena sojina moka H_2O NaOH do pH = 8





POGLAVJE 2

KARAKTERIZACIJA SPS, ZLASTI NJEGOVA PORAZDELITEV MOLEKULSKE MASE

S pomočjo gelske kromatografije na HPLC opremi (Waters pump model 6000, Waters data module 730 in Waters refractometer R 401) določimo porazdelitev molekulske mase SPS, katerega proizvodnjo izvedemo, kot je navedeno v tem opisu (sl. 4). S pomočjo iste metode smo določili tudi porazdelitev molekulske mase razgradnih produktov SPS s pomočjo SPS-aze (sl. 5). Nadalje smo s pomočjo iste metode dokazali

vezalni učinek med sojinim proteinom in SPS (sl. 6) in odsotnost vezalnega učinka med sojinim proteinom in SPS, razgrajenim s pomočjo sredstva v skladu z izumom (sl. 7).

Kalibracijsko krivuljo (logaritem molekulske mase, nanesen proti R_f , kjer definiramo R_f vrednost za glukozo arbitratno kot 1, in je R_f vrednost za določeni dekstran definirana kot retentijski čas za ta dekstran, dividiran z retencijskim časom za glukozo) smo določili s pomočjo več standardnih dekstranov z znanimi molekulskimi masami (T 4, T 10, T 40, T 70, T 110, T 500) firme Pharmacia Fine Chemicals AB, Box 175, S-75104, Uppsala, Švedska. Ugotovili smo R_f -vrednost za maksimum vsakega pika dekstrana in ustrezno molekulsko maso izračunali kot $\sqrt{\bar{M}_w \cdot \bar{M}_n}$, pri čemer je \bar{M}_w povprečna vrednost molekulske mase v skladu z maso in \bar{M}_n povprečna vrednost mo-

lekulske mase v skladu s številom. Kot eluent za ta kromatografski postopek smo uporabili 0,1 M NaNO_3 . Koloni, ki smo ju uporabili pri kromatografskem postopku, sta 60 cm PW 5000, nato pa 60 cm PW 3000 firme Toyo Soda Manufacturing Co., Japonska. Na ta način smo ugotovili za zgoraj navedene dekstrane razmerje med molekulsko maso in R_f , glej sl. 3.

Na osnovi sl. 4 lahko izračunamo, da ima SPS porazdelitev molekulske mase, ki ima za posledico vrednost \bar{M}_w okoli $5,4 \times 10^5$ in vrednost \bar{M}_n okoli $4,2 \times 10^4$. Iz te slike je razvidno tudi, da kaže kromatogram dva izrazita pika pri retencijskem času 34,5 minut (6 %), kar ustreza molekulski teži okoli 5×10^6 , in retencijskem času 47,12 minut (67 %), kar ustreza molekulski masi okoli $4,9 \times 10^4$. Iz te krivulje je razvidno tudi, da obstoji med tema dvema pikoma rama pri retencijskem času 41,25 minut (27 %), kar ustreza molekulski masi $2,8 \times 10^5$.

Po razgradnji SPS z SPS-azo smo hidrolizno zmes membransko filtrirali in filtrat kromatografirali. Ugotovili smo, da se okoli 55 % SPS razgradi v mono-, di- in trisharide, in da se preostalih 45 % razgradi v polimer s tremi piki s sledečimi molekulskimi masami: 5×10^4 , 10^4 in $4,4 \times 10^3$, glej sl. 5.

Da bi dokazali vezalni učinek med sojinim proteinom in SPS in bistveno zmanjšanje vezalnega učinka med sojinim proteinom in SPS, razgrajenim s pomočjo SPS-aze, smo izvedli sledeče poskuse.

3 % SPS v 0,10 M acetatnem puferju s pH 4,5 dodamo k brozgi sojinega izolata (Purina E 500), da dobimo suspenzijo z razmerjem izolat/SPS 10:1. To suspenzijo inkubiramo 18 ur na stresalniki kopeli pri 50°C. Po inkubaciji suspenzijo centrifugiramo in bistri supernatant analiziramo s HPLC, kot smo opisali preje. Iz sl. 6 v primerjavi s sl. 4 je razvidno, da se je SPS popolnoma adsorbiral na sojin izolat.

Teži postopek, kot je naveden v prejšnjem odstavku, izvedemo s 3 % SPS raztopino, hidrolizirano z SPS-azo, proizvedeno s pomočjo CBS 101.43 (sl. 7). Primerjava med sl. 7 in sl. 5 kaže, da se na sojin izolat ne adsorbira nobena spojina v hidroliziranem SPS z molekulsko maso pod okoli 10⁴. Hidroliza zmanjša kvantitativno vezavo na okoli 10 do 15 % glede na vezavo SPS na sojin protein.

NMR analiza SPS, katerega proizvodnjo izvedemo, kot je navedeno v tem opisu, pokaže sledečo približno sestavo SPS:

- 1) α -galakturonska kislina v količini okoli 45 %, pri čemer je približno 40 % celotne količine α -galakturonske kisline prisotnih kot metil ester,
- 2) ramnopiranoza v količini okoli 20 %,
- 3) galaktopiranoza v količini okoli 15 % in
- 4) β -ksilopiranoza v količini okoli 20 %.

Izgleda, da so sestavine prisotne v strukturi, ki obsega ramnogalakturonsko ogrodje in stranske verige ksiloze in galaktoze.

Popolna kislá hidroliza SPS (8 ur v 1 N H₂SO₄) in temu sledeča TLC (tenkoslojno kromatografska) analiza sta pokazali, da so bile v hidroliziranem SPS prisotne tudi manjše količine monosharidov fukoze in arabinoze.

HPLC analiza SPS, razgrajenega z encimskim kompleksom SPS-aze, ki ga je tvoril CBS 101.43, kaže močno zmanjšanje molekulske mase. V skladu s tem kaže NMR spektrum SPS, razgrajenega kot je prikazano zgoraj, da je glavni del estrskih skupin izginil in da se je zmanjšal tudi delež ksiloze in galaktoze v materialu z večjo molekulsko maso. NMR spektrum ~~ti~~stega dela razgradnega produkta SPS, ki se obori pri dodatku enega volumna etanola k enemu volumnu razgradnega produkta SPS, je podoben NMR spektrumu SPS, z zgoraj navedenimi spremembami glede estrskih skupin in deleža ksiloze in galaktoze.

25. 11. 92

- 25 -

BOGLAVJE 3

DOKUMENTACIJA Z DEJSTVOM, DA STA SPS IN APS RAZLIČNI SPOJINI

APS smo pripravili, kot je navedeno v Agr.Biol.Chem., Vol. 36, No. 4, str. 544 - 550 (1972).

Sedaj smo ta polisaharid in SPS hidrolizirali z različnimi encimi, nekateri smo razgradnje zmes gelsko kromatografirali na HPLC opremi, kot je navedeno v poglavju 2, "Karakterizacija SPS, zlasti njegova porazdelitev molekulske mase".

Natančneje, hidrolize smo izvedli z obdelavo 25 ml raztopine 2 % APS ali 2 % SPS v 0,1 M acetatnem puferju s pH 4,5 z 10 mg KRF 68 ali 30 mg Pectolyase. KRF 68 je pripravek SPS-aze, katerega priprava je opisana v primeru 1. Rezultati so razvidni iz sledeče tabele.

Polisaharid	Enzim	HPLC gelski chromatogram	Polisaharid	
			razgrajen	nerazgrajen
APS	Pectolyase	slg. 8	x	
APS	KRF 68	slg. 9	x	
SPS	Pectolyase	slg. 10		x
SPS	KRF 68	slg. 5	x	

POGLAVJE 4

SELEKCIJONIRANJE MIKROORGANIZMOV, KI PROIZVAJAJO SPS-AZO

Mikroorganizem, ki ga nameravamo testirati, inkubiramo na poševnem agarnem substratu s sestavo, ki omogoča rast mikroorganizma. Po začetni rasti na poševnem agarnem substratu prenesemo mikroorganizem v tekoči glavni substrat, v katerem je glavni ~~vir~~ ogljika SPS (pripravljen, kot je navedeno), v katerem je vir dušika NO_3^- , NH_4^+ , sečnina, proste amino kisline, proteini ali druge spojine, ki vsebujejo dušik, in ki vsebuje poleg tega zmes potrebnih soli in vitaminov, prednostno v obliki kvasnega ekstrakta. Sestava glavnega substrata je odvisna od rodu mikroorganizma, pri čemer je glavni problem v tem, da mora biti glavni substrat sposoben, da podpira rast in metabolizem mikroorganizma. Ko je v primerno dolgem času, reda velikosti od 1 do 7 dni, kar je odvisno od hitrosti rasti navedenega mikroorganizma, prišlo do rasti, analiziramo vzorec fermentacijske brozge na SPS-azo v skladu z encimskim določevanjem SPS-aze, opisanim v tem opisu, ali v skladu s katerimkoli drugim določevanjem SPS-aze, prilagojenim drugačnim posebnim uporabam SPS-aze in ne uporabi kot sestavine sredstva za razgradnjo sojinega preostanka.

Da bi dosegli občutljivejšo metodo za določanje encimske aktivnosti, lahko med določanjem aktivnosti SPS-aze temperaturo znižamo na 40°C in inkubacijski čas podaljšamo na 20 ur, pri

2 5. 11. 92

- 26 -

čemer je treba substratu dodati antibiotike, da se izognemo
infekciji.

Če se držimo te testne metode, lahko najdemo druge
mikroorganizme, ki proizvajajo SPS-azo, take, ki spadajo k
rodu *Aspergillus*, in take, ki spadajo k drugim rodovom.

25. 11. 92

- 27 -

POGLAVJE 5

KARAKTERIZACIJA NEKATERIH MIKROORGANIZMOV, KI TVORIJO SPS-AZO

V skladu s tukaj navedenim selekcioniranjem mikroorganizmov, ki proizvajajo SPS-azo, smo ugotovili, da so mikroorganizmi, navedeni v zgornjem delu sledeče tabele, proizvajalci SPS-aze. Tabela vsebuje tudi sev, ki spada k species Asp. japonicus, ki ni proizvajalec SPS-aze.

Proizvajalec SPS-aze		Species		Nose identifikacijska označba	identifikacijska označba	Prvo deponiranje leta
Da	Ne	Asp. japonicus	Asp. aculeatus			
x			x	A 805	CBS 101.43; DSM 2344	1943
x		x		A 1443	IFO 4408; DSM 2346	1950
	x	x		A 1384	ATCC 20236; DSM 2345	1969

Kratko identifikacijo zgoraj navedenih sevov lahko najdemo v sledečih katalogih kultur.

List of Cultures 1978 Centraalbureau voor Schimmelfcultures, Baarn, Nizozemska.

Institute for Fermentation Osaka, List of Cultures, 1972, 5th edition, 17 - 85, Juso-honmachi 2-chome, Yodogana-ku, Osaka 532, Japonska.

25. 11. 92

- 29 -

The American Type Culture Collection **Catalogue of Strains I**, 14th edition 1980, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852.

Vsi sevi v zgoraj navedeni tabeli skoraj popolnoma ustrezajo taksonomijskemu opisu species *Asp. japonicus* in *Asp. sculeatus*, objavljenem v The genus *Aspergillus* Raperja in Fennella, 1965 (glej zlasti strani 327 - 330).

25. 11. 92

- 29 -

POGLAVJE 6

SPLOŠNI OPIS PREKRIVNE TEHNIKE, POVEZANE Z IMUNOELEKTRO- FOREZO

Prijaviteljica je razvila za identifikacijo posameznih komponent encimskega kompleksa z navzkrižno imuno elektroforezo s polispecifičnim protitelesom proti vsem encimskim sestavinam v encimskem kompleksu metodo, imenovano prekrivna tehnika z vrhnjim agarjem. Metoda temelji na dejstvu, da so tudi po specifični vezavi encima s protitelesom encimi še vedno aktivni, ali povedano drugače, da aktivno mesto encima ni identično z mestom vezave encima s protitelesom. Kompleksi encima s protitelesom se obarjajo med elektroforezo kot različni loki v gelu. Ploščo gela prekrijemo s topnim SPS v vrhnjem agarju. Po 20-urnem segrevanju na 45°C v atmosferi z relativno vlago 100 % se bo lok, ki ima aktivnost SPS-aze, pojavil kot bistrača secona v prekrivnem SPS po obarjanju z zmesjo enakih volumenskih delov etanola in acetona, če opazujemo proti črnemu ozadju. Loki, ki nimajo aktivnosti SPS-aze, ostanejo nevidni.

25. 11. 92

- 30 -

POGLAVJE 7

IMUNOELEKTROFORETIČNA KARAKTERIZACIJA SPS-AZE S POLISPECIFIČNIM PROTITELESOM IN **PREKRITJEM**

Kunce smo imunizirali z encimskim kompleksom, ki vsebuje SPS-azo, dobljenim s fermentacijo *Aspergillus aculeatus* CBS 101.43, kot je navedeno v primeru 1 (KRF 68), in polispecifično protitelo smo pridobili na sam po sebi znan način. S pomočjo tega polispecifičnega protitelesa smo izvedli navskrižno imunoelktroforezo encimskega kompleksa, dobljenega s fermentacijo *Asp. aculeatus* CBS 101.43, kot je navedeno v primeru 1 (KRF 68), kot je opisano v N.H. Axelsen et al., "A Manual of Quantitative Immunoelctrophoresis", 6' printing 1977. Sklicujemo se na sliko 11, ki kaže loke, ki ustrezajo različnim proteinom, ki jih proizvaja mikroorganizem. S pomočjo prej opisane prekrivne tehnike z vrhnjim agarjem ugotovimo, da ustreza poševnočrtkano področje SPS-azi.

Če je prej navedena hipoteza, ki obsega domnevo, da sestoji SPS-aza iz najmanj dveh encimov, pravilna, je poševnočrtkano področje področje, v katerem so prisotni vsi encimi, ki so odgovorni za aktivnost SPS-aze. Če bi te encime pri drugih oblikah encima ločili z imunoelktroforezo na tak način, da ne bi prekrivali nobenega skupnega področja, lahko del aktivnosti SPS-aze še vedno identificiramo s pomočjo imunoelktroforeze s **prekritjem** tako z SPS kot s tržno pektinazo.

25. 11. 92

- 32 -

POGLAVJE 8

ČIŠČENJE PRIPRAVKA SPS-AZE

Čiščenje pripravka SPS-aze KRF 92 (glej primer 1) smo izvedli z ionsko izmenjavo. Pufer je 50 mM Tris (tris-hidroksimetilaminometan), ki ga uravnamo s HCl na pH 7,0. Kolona je K 5/30 firme Pharmacia, Švedska. Ionski izmenjevalni material je DEAE-trisacryl firme LKB, Bromma, Švedska (300 ml). Pretočna hitrost je 100 ml/h.

15 g pripravka SPS-aze KRF 92 smo raztopili v 450 ml H₂O s 6°C in vse v nadaljevanju navedene operacije izvedli med 6°C in 10°C. Z 1 M Tris smo pH uravnali na 7,0. Kolono smo uravnotežili s puferjem in nato dali na kolono vzorec SPS-aze. V elustu smo izmerili optično gostoto pri 280 nm in prevodnost, pri čemer se sklicujemo na sliko 12. Frakcija 1 je eluat, ki se ne veže na ionski izmenjevalni material. Kolono nato speremo z 2000 ml puferja, kar da frakcijo 2. Sedaj uvedemo gradient 0 do 500 mM NaCl, kar da frakcije 3 do 9. Vseh 9 frakcij smo koncentrirali na 200 ml in dializirali proti vodi s pomočjo dialize (Hollow Fiber DP 2 firme Amicon, Massachusetts, U.S.A.) do prevodnosti 2 mS. Nato smo vseh devet frakcij liofilizirali. Samo frakciji 1 in 2 sta kazali aktivnost SPS-aze.

Frakcijo 1 smo dalje očistili z gelsko filtracijo. 1,5 g frakcije 1 smo raztopili v 10 ml 50 mM natrijevega acetata

25. 11. 92

- 33 -

s pH 4,5 (500 mM KCl). Kolona je 2,5 x 100 cm firme LKB. Polnilni material za gelsko filtracijo je Sephacryl S-200 firme Pharmacia, Švedska. Pretočna hitrost je 30 ml/h. Frakcije, ki vsebujejo materiale z molekulskimi masami med 70.000 in 100.000, kalibriranimi z globularnimi proteini, so vsebovale encimski kompleks, imenovan faktor G, ki ne more razgraditi SPS, če ga testiramo v skladu s kvalitativnim agarskim testom; vendar pa se SPS razgradi v skladu s kvalitativnim agarskim testom, če pomešamo faktor G s pektinazo. Ugotovili smo, da je faktor G sposoben, da odcepi od SPS galaktozo, fukozo in nekaj galakturonske kisline, vendar pa je glavni razgradni produkt v skladu s HPLC analizo še vedno visokomolekulski produkt, ki je zelo podoben SPS.

2 5. 11. 92

- 33 -

POGLAVJE 9

ODVISNOST AKTIVNOSTI OD pH, ODVISNOST AKTIVNOSTI OD TEMPERATURE IN STABILNOST SPS-AZE

Slika 13 kaže odvisnost aktivnosti pripravka SPS-aze KRF 68 od pH. Od pH 2,7 do pH 3,5 smo uporabljali puferni sistem z mrevljinčno kislino, in od pH 3,7 do 5,5 smo uporabljali acetatni puferni sistem.

Slika 14 kaže odvisnost aktivnosti pripravka SPS-aze KRF 68 od temperature.

Slika 15 kaže temperaturno stabilnost pripravka SPS-aze KRF 68.

25. 11. 92

- 35 -

POGLAVJE 10

DOLOČITVE ENCIMSKE AKTIVNOSTI

Spodaj navedena tabela je pregled različnih določitev encimske aktivnosti, ki se tičejo izuma.

Definicija enote aktivnosti in opis določevanja encimske aktivnosti				
Enzime	Vrsta aktivnosti kratka označba	Javno razpoložljivo	Opisano kasneje v tem opisu specification	Referenca
SPS-asa	SPS-asa		x	
Solubiliziranje preostanka	SRU	x		1
	SRUM-120		x	
Proteaze	HUT		X	
Calulaze	C _x	x		2
Pektinaze	PU	x		3
	PGE	x		4
	UPTE	x		5
	PEE	x		6
Hemicelulaza	VHCU	x		7

Reference, navedene v zadnji koloni gornje tabele, so nadrobno razložene v spodaj navedeni tabeli.

Referenca št.	Identificacijska reference	Referenco se da dobiti od		
		NOVO INDUSTRI A/S, Novo Allé, 2880 Bagsværd, Danska	Schweizerische Ferment AG, Basel, Švice	knjigarne
1	Analyseforskrift AF 154/4, datirano 1981-12-01	x		
2	Analytical Biochemistry 84, 522 - 532 (1978)			x
	Analytical method AF 149/6-GB, datirano 1981-05-25	x		
3	Determination of Pectinase Activity with Citrus Pectin (PU), datirano 23.3.1976		x	
4	Viskosimetriscche Polygalacturonase-Bestimmung, (PGE), datirano 10.11.77		x	
5	Bestimmung der Pectintranseliminase (UPTE/g), datirano 24. Sep. 1975		x	
6	Determination of the Pectinesterase activity (nedatirano) z različnicami WJA/GW		x	
7	Analytical method AF 156/1-GB	x		

V zvezi z določitvijo aktivnosti celulaze lahko pripomnimo, da smo izvedli analizo tako, kot je navedeno v AF 149/6-GB, in da so principi določitve razloženi v Analytical Biochemistry.

POGLAVJE 10 a

ENCIMSKO DOLOČEVANJE SPS-AZE

Encimsko določevanje SPA-aze izvedemo v dveh stopnjah, to je s kvalitativnim testom na agarni plošči in kvantitativnim določevanjem aktivnosti SPS-aze, ki temelji na merjenju količine celokupnih sproščenih sladkorjev. Če je kvalitativni test na agarni plošči negativen, je aktivnost SPS-aze 0, ne glede na vrednost, ki izvira iz kvantitativnega določevanja aktivnosti SPS-aze. Če je kvalitativni test na agarni plošči pozitiven, je aktivnost SPS-aze enaka vrednosti, ki izvira iz kvantitativnega določevanja aktivnosti SPS-aze.

I. Kvalitativni test na agarni plošči

SPS-agarno ploščo smo pripravili na sledeči način. Pufer (B) pripravimo tako, da uravnamo 0,3 M očetno kislino na pH vrednost 4,5 s pomočjo 1 N NaOH. 1 g SPS raztopimo v 20 ml B. 1 g agaroze (HSB Litex) pomešamo z 80 ml B in med mešanjem segrejemo do vrelišča. Ko se agarozna raztopi, počasi dodamo raztopino SPS. Nastalo 1 %-no raztopino SPS v agarozni damo v vodno kopel s 60°C. Sedaj ulijemo plošče tako, da nalijemo 15 ml 1 %-ne raztopine SPS v agarozni na horizontalno stekleno ploščo z dimenzijami 10 cm x 10 cm. Nato vtisnemo v strjeno plast SPS-agaroze 9 vdolbin v razdalji po 2,5 cm. V vsako vdolbino damo 10 μ l 1 %-ne raztopine **encimskega proteina**.

ki ga testiramo na aktivnost SPS-aze. Ploščo inkubiramo 18 ur pri 50°C in relativni vlagi 100 %. Sedaj oborimo še nerazgrajeni SPS z raztopino enakih volumenskih delov etanola in acetona. Test na SPS-azo na agarni plošči je za vzorec, ki smo ga dali v določeno vdolbino, pozitiven, če se okoli te vdolbine pojavi bistra obročasta cona.

II. Test za kvantitativno določevanje aktivnosti SPS-aze

Namen tega testa je določevanje encimskih aktivnosti, ki so sposobne, da razgrade SPS do take mere, da kažejo razgradni produkti zelo zmanjšano ali nikakršno adsorpcijsko ali vezalno afiniteto do sojinega proteina. Poskusi so pokazali, da del razgradnih produktov SPS, ki se ne obore z zmesjo enakih volumnov vode in etanola, nima nikakršne adsorpcijske ali vezalne afinitete do sojinega proteina.

Določevanje SPS-aze temelji na hidrolizi SPS pri standardnih pogojih, ki ji sledi obarjanje tistega dela SPS, ki se ne hidrolizira z etanolom. Po obarjanju določimo delež ogljikovega hidrata, ki se ne obori, s kvantitativno določitvijo celokupnega sladkorja (v skladu z AF 169/1, ki ne razpolago pri NOVO INDUSTRI A/S 2880 Bagsvaerd).

25. 11. 92

- 38 -

Standardni pogoji so:

temperatura: 50°C

pH: 4,5

reakcijski čas: kontrola 210 minut samo s substratom,
nato pa 2 minuti z dodanim encimom

- - : glavna vrednost 212 minut

Oprema obsega:

stresalno vodno kopel, termostatirano na 50°C

vrtiločno mešalo

centrifugo

ledeno vodno kopel.

Reagenti obsegajo:

pufer: 0,6 M očetna kislina v demineralizirani
vodi (a)

1,0 M NaOH (b)

substrat: pH vrednost 50 ml a uravnamo z b na 4,5,
nato dodamo 4,0 g SPS in po raztapljanju
SPS pH ponovno uravnamo na 4,5 in volumen
naravnamo z deionizirano vodo na 100 ml.

prekinje-

valni

reagent: absolutni etanol.

1 enota aktivnosti SPS-aze (SAE ali SPSU) je definirana kot aktivnost SPS-aze, ki pri zgoraj navedenih standardnih pogojih sprosti količino ogljikovega hidrata, topnega v 50 %-nem etanolu, ki je ekvivalentna 1 mikromolu galaktoze na minuto.

Celo če je začetni del encimske standardne krivulje premica, pripominjamo, da ne seka točke (0,0).

POGLAVJE 10 b

ENCIMSKO DOLOČEVANJE SOLUBILIZIRNE AKTIVNOSTI ZA PREOSTANEK,
IZRAŽENE KOT SRUM 120

Princip

Pri metodi za določevanje hidrolizne aktivnosti hidroliziramo netopni del moke iz razmaščene, deproteinizirane in oluščene soje pri standardnih pogojih. Encimsko reakcijo prekinemo s prekinjevalnim reagentom in netopni del odfiltriramo. Količino raztopljenih polisaharidov določimo spektrofotometrično po kislinski hidrolizi v skladu z AS 169/1, ki je na razpolago pri NOVO INDUSTRI A/S 2880 Bagsværd.

V skladu z metodo določimo karbohidraze z endo- kot tudi z ekso-aktivnostjo.

Substrat, ki se tiče tega encimskega določevanja, je identičen substratu preostanka, opisanemu za metodo SRU. Substrat raztopimo kot 3 %-no raztopino v spodaj navedenem citratnem puferju:

0,1 N citrat-fosfatni pufer pH 4,5

5,24 g monohidrata citronske kisline (Merck Art 244)

8,12 g dihidrata dinatrijevega hidrogenfosfata

(Merck Art 6580)

demineralizirana voda do 1 l

pH 4,5 \pm 0,05

obstočnost 14 dni

25. 11. 92

-412--

Prekinjevalni reagent ima sledečo sestavo:

100 ml 0,5 N NaOH

200 ml 96 %-nega etanola

hraniti v hladilniku do uporabe.

Standardni pogoji

temperatura 50°C

pH 4,5

reakcijski čas, vzorec 120 minut

- | - kontrola 5 minut.

Definicija enote

Ena enota solubilizirne aktivnosti za sojin preostanek (SRUM) 120 (M za manualno) je količina encima, ki pri navedenih reakcijskih pogojih sprosti na minuto solubilizirane polisaharide, ekvivalentne enemu mikromolu galaktoze.

25. 11 92

- 42 -

POGLAVJE 10 c

ENCIMSKO DOLOČEVANJE PROTEOLITSKE AKTIVNOSTI

MERITEV HUT

Metoda za določevanje proteinaze v kislem mediju.

Metoda temelji na 30 minutnem digeriranju denaturiranega hemoglobina z encimom pri 40°C in pH 3,2. Nedigerirani hemoglobin oborimo s 14 %-no trikloroocetno kislino (m/v %).

Vse encimske vzorce pripravimo tako, da jih raztopimo v 0,1 M acetatnem puferju, pH 3,2.

Hemoglobinski substrat pripravimo ob uporabi 5,0 g liofiliziranega govejega hemoglobina v prahu, konzerviranega z 1 % Thiomersalata in 100 ml demineralizirane vode, ki jo mešamo 10 minut, nakar pH uravnamo z 0,33 N HCl na 1,7.

Po nadaljnjih 10 minutah mešanja uravnamo pH z 1 N NaOH na pH 3,2. Volumen te raztopine povečamo z 0,2 M acetatnim puferjem na 200 ml. Ta hemoglobinski substrat mora biti v hladilniku, kjer se drži 5 dni.

Hemoglobinski substrat spravimo na sobno temperaturo. Ob času 0 dodamo v epruveto, ki vsebuje 1 ml encima, 5 ml substrata. Po stresanju 1 sekundo damo epruveto za 30 minut v vodno kopel s 40°C. Po točno 30 minutah dodamo v epruveto 5 ml 14 %-ne trikloroocetne kisline in nato 40 minut stresamo in spravimo na sobno temperaturo.

Za kontrolo spravimo hemoglobinski substrat na sobno

25. 11. 92

- 43 -

temperaturo. Ob času 0 dodamo v epruveto, ki vsebuje 1 ml encima, 5 ml substrata. Po stresanju 1 sekundo damo epruveto za 5 minut v vodno kopel s 40°C. Po točno 5 minutah dodamo v epruveto 5 ml 14 %-ne trikloroocetne kisline, in nato 40 minut stresamo in spravimo na sobno temperaturo.

Po 40 minutah kontrolo in vzorce stresemo, filtriramo enkrat ali dvakrat skozi filter Berzelius št. 0 in damo v spektrofotometer. Vzorec odčitamo v primerjavi s kontrolo pri 275 nm, spektrofotometer pa justiramo proti vodi.

Ker je absorbanca tirozina pri 275 nm znan faktor, ni potrebno določiti tirozinske standardne krivulje, razen če je to potrebno za kontrolo Beckmanovega spektrofotometra.

Izračunavanje

1 HUT je količina encima, ki tvori v 1 minuti hidrolizat, ki je po svoji absorbanci pri 275 nm ekvivalenten raztopini 1,10 µg/ml tirozina v 0,006 N HCl. Ta vrednost absorbance je 0,0084. Reakcija naj se izvrši v 30 minutah pri 40°C in pH 3,2.

$$\text{HUT} = \frac{\text{Vzorec-Kontrola}}{0,0084} \times \frac{\text{vol. v ml}}{\text{reakcijski čas v min.}}$$

$$\text{HUT} = \frac{\text{Vzorec-Kontrola}}{0,0084} \times \frac{11}{30} = (V-K) \times 43,65$$

$$\text{HUT/g encima} = \frac{(V-K) \times 43,65}{\text{g encima v 1 ml}}$$

25. 11. 92

- 44 -

Preiskava odvisnosti pH-stabilnosti proteaze v KRF 68, izvedena s pomočjo analize HUT s pH vrednostmi od 2,0 do 8,0, je pokazala, da je bila stabilnost proteaze nad pH 8,0 zelo majhna, glej sl. 16.

Da bi pojasnili izum, se sklicujemo na sledeče primere 1 do 8, kjer ponazarja primer 1 proizvodnjo SPS-aze in kjer ponazarjajo primeri 2 do 8 uporabo SPS-aze pri surovini na osnovi soje, da bi proizvedli očiščen rastlinski protein. Druge uporabe SPS-aze so navedene v poglavju med primerom 8 in pregledom slik.

Izvedli smo več fermentacij s tukaj navedenimi sevi *Asp. aculeatus* in *Asp. japonicus* v laboratorijskem merilu. Pri tem smo dobili pripravke, ki so vsebovali SPS-azo v skladu s tukaj navedenim testom za SPS-azo. Ker pa so za izvedbo poskusov uporabe potrebne precej velike količine SPS-aze, smo izvedli podobne fermentacije v merilu pilotne naprave, glej sledeči primer 1.

PRIMER 1

Proizvodnja SPS-aze v merilu pilotne naprave.

SPS-azo smo pripravili s submerzno fermentacijo *Aspergillus aculeatus* CBS 101.43.

V Fernbachovi buči smo pripravili agarni substrat s sledečo sestavo:

Pepton Difco	6 g
Aminolin Ortana	4 g
Glukoza	1 g
Kvasni ekstrakt Difco	3 g
Mesni ekstrakt Difco	1,5 g

KH_2PO_4 Merck	20 g
Sladni ekstrakt Evers	20 g
Ionsko izmenjana H_2O ad	1000 ml.

pH smo uravnali na 5,30 do 5,35. Nato smo dodali 40 g agarja Difco in zmes avtoklavirali 20 minut pri 120°C (substrat imenujemo E-agar).

Sev CBS 101.43 smo kultivirali na poševnem E-agarju (37°C). Spore s poševnega gojišča smo suspendirali v steriliziranem posnetem mleku in suspenzijo liofilizirali v stekleničkah. Vsebino ene liofilizirane stekleničke smo prenesli v Fernbachovo bučo. Bučo smo nato inkubirali 13 dni pri 30°C .

V 500 litrskem inokulacijskem fermentorju smo pripravili substrat s sledečo sestavo:

CaCO_3	1,2 kg
Glukoza	7,2 kg
Rofec (suha snov vodnega macerata koruze)	3,6 kg
Sojino olje	1,2 kg

Dodali smo vodovodno vodo do skupnega volumna okoli 240 litrov. Pred dodatkom CaCO_3 smo pH uravnali na 5,5. Substrat smo sterilizirali v inokulacijskem fermentorju 1 uro pri 321°C . Končni volumen pred inokulacijo je bil okoli 300 litrov.

Suspenzijo spor iz Fernbachove buče smo prenesli v inokulacijski fermentor. Pogoji inokulacijske fermentacije so bili:

25. 11. 92

- 47 -

Vrsta fermentorja: konvencionalni fermentor z mešanjem in zračenjem, razmerje višina/premer okoli 2,3

Mešanje: 300 vrt./min (dve turbinski mešali)

Zračenje: 300 normalnih litrov zraka na minuto

Temperatura: 30 do 31°C

Tlak: 1,5 bara

Čas: okoli 28 ur.

Okoli 28 ur po inokulaciji smo iz inokulacijskega fermentorja prenesli 150 litrov v glavni fermentor.

V 2500 litrskem glavnem fermentorju smo pripravili substrat s sledečo sestavo:

Pražena sojina moka 90 kg

KH_2PO_4 20 kg

Pluronic® 150 ml

Dodali smo vodovodno vodo do skupnega volumna okoli 900 litrov. Praženo sojino moko smo suspendirali v vodi. pH smo z NaOH naravnali na 8,0 in temperaturo zvišali na 50°C. Nato smo suspenziji dodali okoli 925 Ansonovih enot ALCALASE® 0,6 L. Zmes smo vzdrževali 4 ure pri 50°C in pH = 8,0 (dodatek Na_2CO_3) brez zračenja, brez nadtlaka in ob mešanju s 100 vrt./min. Nato smo dodali preostale sestavine substrata in uravnali pH s fosforjevo kislino na okoli 6,0. Substrat smo sterilizirali v glavnem fermentorju $1\frac{1}{2}$ ure pri 123°C. Končni volumen pred

25. 11. 92

- 48 -

inokulacijo je bil okoli 1080 litrov.

Nato smo dodali 150 litrov inokulacijske kulture.

Fermentacijski pogoji so bili:

Vrsta fermentorja: konvencionalni fermentor z zračenjem
in mešanjem, razmerje višina/premer
okoli 2,7.

Mešanje: 250 vrt./min. (dve turbinski mešali)

Zračenje: 1200 normalnih litrov zraka na
minuto

Temperatura: 30°C

Tlak: 1,5 bara

Čas: okoli 151 ur.

Med 24 urami fermentacije do okoli 116 ~~ur~~ fermentacije
smo v glavni fermentor aseptično dodajali raztopino pektina
s stalno hitrostjo okoli 8 litrov na uro. Raztopino pektina
s sledečo sestavo smo pripravili v 500-litrski dozirni posodi:

Pectin genu ^{x)}	22 kg
Fosforjeva kislina, konc.	6 kg
Pluronic [®]	50 ml

x) Genu pectin (citrus type NF firme The Copenhagen
pectin factory Ltd.)

Dodali smo vodovodno vodo do skupnega volumna okoli
325 litrov. Substrat smo sterilizirali v dozirni posodi 1 uro
pri 121°C. Končni volumen pred začetkom doziranja je bil okoli

360 litrov. Ko je ta porcija pošla, smo naredili drugo podobno porcijo. Celotni volumen raztopine pektina za eno fermentacijo je bil okoli 725 litrov.

Po okoli 151 urah fermentacije smo fermentacijski proces prekinili. Okoli 1850 litrov kulturne brozge smo ohladili na okoli 5°C in encime dobili v skladu s sledečo metodo.

Kulturno brozgo smo bobensko filtrirali na vakuumskem bobnastem filtru (Dorr Oliver), ki smo ga pred tem preslojili s Hy-flo-super-cel diatomejsko zemljo (filtrirni pripomoček). Filtrat smo koncentrirali z uparivanjem na okoli 15 % volumna kulturne brozge. Koncentrat smo filtrirali na Seitzovem filtru (tip supra 100) z 0,25 % Hy-flo-super-cela kot filtrirnim pripomočkom (v sledeči tabeli imenovana filtracija I). Filtrat smo oborili s 561 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /l pri pH 5,5, in kot filtrirni pripomoček smo dodali 4 %-no Hy-flo-super-cel diatomejsko zemljo. Oborino in filtrirni pripomoček ločimo s filtracijo na filtru z okvirom. Filtrsko pogačo raztopimo v vodi in netopne dele ločimo s filtracijo na filtru z okvirom. Filtrat kontrolno filtriramo na Seitzovem filtru (tip supra 100) z 0,25 % Hy-flo-super-cela kot filtrirnim pripomočkom (v sledeči tabeli imenovana filtracija II). Filtrat diafiltriramo na pripravi za ultrafiltracijo. Po diafiltraciji koncentriramo tekočino do deleža suhe snovi 12,7 % (v sledeči tabeli imenovan delež suhe snovi v koncentratu).

V tej stopnji lahko izvedemo fakultativno bazično obdelavo za delno odstranjevanje proteazne aktivnosti. V pri-

meru, da uporabimo bazično obdelavo, jo izvajamo pri pH 9,2 1 uro, nakar uravnamo pH vrednost na 5,0.

Sedaj tekočino kontrolno filtriramo in filtriramo z namenom, da zmanjšamo klice, in filtrat liofiliziramo na opremi za liofiliziranje firme Stokes.

Na spodaj opisani način smo izvedli štiri fermentacije, pri čemer smo, kot je navedeno v sledeči tabeli, variirali sev, uporabljen za fermentacijo, uporabo fakultativne bazične obdelave in druge parametre.

Mikroorganizem	Bazična obdelava		Šifra prip- ravka	Koncentracija (%) filtrirnega pripomočka v zvezi s			Delež suhe sno- vi v kon- cen- tra- tu	Opom- be
	upo- rabljena	neupo- rabljena		fil- traci- jo I	obar- jan- jem	fil- traci- jo II		
CBS 101.43		x	KRF 68	0,5	5	0,2	28	
ATCC 20236		x	KRF 74	2,0	4	0,4	7,5	
IFO 4408		x	KRF 83	1,0	5	0,25	12,4	x)
CBS 101.43	x		KRF 92	0,25	4	0,25	12,7	

x) Po filtraciji za zmanjšanje klic koncentriramo filtrat z uparevanjem v razmerju 1:2,3. Manjši del koncentriranega filtrata razpršilno posušimo, preostali del pa liofiliziramo.

Da bi še bolj zmanjšali proteazno aktivnost, smo nekatere od zgoraj navedenih pripravkov obdelali, kot je navedeno spodaj, pri čemer smo uporabljali samo eno od treh alternativ A, B in C.

25. 11. 92

- 51 -

A. 100 g pripravka SPS-aze raztopimo v 1 litru deionizirane vode med mešanjem pri $10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. pH uravnamo s 4 N NaOH na 9,1. To bazično obdelavo izvajamo 1 uro. pH vrednost nato z ledno očetno kislino uravnamo na 4,5 in dializiramo proti ledeno mrzli, deionizirani vodi do prevodnosti 3 mS. Nato izvedemo zamrzovanje in liofiliziranje.

B. 500 g pripravka SPS-aze raztopimo v 4 litrih deionizirane vode med mešanjem pri $10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. pH uravnamo s 4 N NaOH na 9,1. To bazično obdelavo izvajamo 1 uro. pH vrednost nato uravnamo z ledno očetno kislino na 5,0. Dobljeni material liofiliziramo.

C. 50 g SPS-aze raztopimo v 400 ml deionizirane vode med mešanjem pri $10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. pH uravnamo s 4 N NaOH na 9,1. To bazično obdelavo izvajamo 1 uro. Nato pH zmanjšamo z ledno očetno kislino na 5,7. Dobljeni material liofiliziramo.

Pripravek SPS-aze, uporabljen kot izhodni material za bazično obdelavo	Uporabljena bazična obdelava			Šifra pripravka
	A	B	C	
KRF 68	x			KRF 68 BII
KRF 68		x		KRF 68 BIII
KRF 92			x	KRF 92 BI

Zgoraj navedeni pripravki so označeni s svojimi aktivnostmi encimov, ki so za izum pomembni, v sledeči tabeli.

Encimska aktivnost na 8	KRF 68	KRF 68 BII	KRF 68 BIII	KRF 74	KRF 83	KRF 92	KRF 92 BI
	+	+	+	-	+	+	+
SAE	350	301	349	0	168	476	430
Test na plošči							
Kvantitativni test							
SRU	737	507	481	142	683	626	757
SRUM ₁₂₀	2125	1560	1720	578	753	1640	1030
HUT pH 3,2	67000	105	339	1630	12800	5960	397
C _x	8000	8044	9396	1320	8040	5700	3092
PU	10300000	9000000	8800000	840000	7500000	8400000	7600000
PGE	119400	72000	77700	4100	64600	60000	68800
UPTE	78100	83700	76900	15130	327000	44000	62400
PEE	840	910	770	370	690	1000	790
VHCU	1600000	1100000	1000000	65000	2200000	1100000	742000

25. 11. 92

- 53 -

PRIMER 2 (primer uporabe)

Ta primer opisuje proizvodnjo p.v.p. iz moke iz oluščene in razmaščene soje, "Sojamel 13" (komercialno na razpolago pri Aarhus Oliefabrik A/S). Delež suhe snovi v tej moki je bil 94,0 % in delež (N x 6,25) na osnovi suhe snovi je bil 58,7 %. Sojino moko smo obdelali s pripravki SPS-aze KRF 68 BII (primer 1) na sledeči način:

85,2 g sojine moke smo suspendirali in mešali pri 50°C v 664,8 g vode in s pomočjo 7,5 ml 6 N HCl smo pH uravnali na 4,5. Dodali smo 50 g raztopine, ki je vsebovala 4,00 g navedenega pripravka SPS-aze, in reakcijsko zmes smo nato mešali 240 minut pri 50°C. Zmes smo nato centrifugirali na laboratorijski centrifugi (Beckman Model J-6B) 15 minut pri 3000 x g. Supernatant smo stehali in analizirali na N po Kjeldahlu in suho snov. Trdno fazo smo nato sprali z volumnom vode, ki je bil ekvivalenten masi supernatanta, dobljenega v prvem centrifugiranju. To operacijo smo izvedli dvakrat. Trdno fazo smo nato liofilizirali, stehali in analizirali na N po Kjeldahlu in suho snov v Qvist's Laboratorium, Marselis Boulevard 169, 8000 Aarhus C, Danska. Ta laboratorij je pooblaščen od države za analize krmil in mlečnih izdelkov. Rezultati, dobljeni pri poskusu, so razvidni iz tabele 2.1:

25. 11. 92

- 54 -

Tabela 2.1 Dobljeni rezultati

Sestavina	Masa g	N x 6,25 %	Suha snov %	Dobitek proteina %	Dobitek suhe snovi %
Sojina moka	85,2	55,2	94,0	100 %	100 %
Pripravek SPS-aze	4,00	75,6	-	6,4 %	-
1. Centrifugat	666	1,50	5,04	21,2 %	42,0 %
p.v.p.	44,5	87,5	95,7	82,7 %	53,2 %

Tako smo dobili p.v.p. s čistoto proteina, to je N x 6,25 na osnovi suhe snovi, 91,4 % in s celotnim dobitkom proteina 83 %.

PRIMER 3 (primer uporabe)

Ta primer smo izvedli, da bi primerjali dobitke proteina, prehransko kvaliteto in nekatere funkcionalne lastnosti sojinih proteinskih produktov, izdelanih s sledečimi tremi postopki:

- A: Tradicionalno izoelektrično obarjanje za proizvodnjo sojinega proteinskega izolata.
- B: Tradicionalno izoelektrično spiranje za proizvodnjo sojinega proteinskega koncentrata.
- C: Izoelektrično spiranje v skladu z izumom, ki vključuje encim za solubiliziranje preostanka, za proizvodnjo p.v.p.

25. 11. 92

- 55 -

Da bi izvedli resnično primerjavo postopka v skladu z izumom (C) s konvencionalnima postopkoma za sojin protein (A in B), smo v vseh treh primerih uporabili isto surovino. Tudi poskuse smo izvedli na tak način, da so bile ustrezne temperature in obdelovalni časi v vseh treh primerih enaki. Samo pH vrednosti so bile zaradi temeljnih razlik med tremi postopki različne.

A. Tradicionalno izoelektrično obarjanje za proizvodnjo
sojinega proteinskega izolata

425,8 g sojine moke (Sojamel 13, proizvajalec Aarhus Oliefabrik A/S) smo ekstrahirali v 3574,2 g vodovodne vode pri 50°C. pH smo uravnali z 20,1 g 4 N NaOH na 8,0. Po 1 uri mešanja smo goščo centrifugirali pri 3000 x g 15 minut v laboratorijski centrifugi (Beckman Model J-6B), pri čemer smo uporabljali 4 enolitrske čaše. Centrifugat I in oborino I smo stehali. Oborino I smo ponovno ekstrahirali z vodo do skupne mase 4000 g. Temperaturo smo vzdrževali pri 50°C, pH uravnali s 4 N NaOH na 8 in goščo mešali še 1 uro. Kot zgoraj smo izvedli centrifugiranje in tehtanje centrifugata II in oborine II. Iz centrifugata I in II in oborine II smo odvzeli vzorce za določevanje po Kjeldahlu in določevanje suhe snovi. Nato smo centrifugata I in II zmešali in vzdrževali pri 50°C. Protein smo nato izoelektrično oborili pri pH 4,5 s pomočjo 45 g 6 N HCl. Po 1 uri mešanja pri 50°C smo protein dobili s centrifugiranjem pri 3000 x g 15 minut. Centrifugat III smo stehali in anali-

25. 11. 92

- 56 -

zirali na N po Kjeldahlu in suho snov. Trdno fazo III smo stehtali in sprali z vodo v količini, ki ustreza masi centrifugata I. Spiranje smo izvedli z enournim mešanjem pri 50°C. Sprani protein smo dobili s centrifugiranjem pri 3000 x g 15 minut. Centrifugat IV in trdno fazo IV smo stehtali. Centrifugat IV smo analizirali na N po Kjeldahlu in suho snov. Trdno fazo smo suspendirali v 1550 g vode s 50°C in pH uravnali s 17 g 4N NaOH na 6,5. Zmes smo mešali še 1 uro in po potrebi ponovno uravnali na pH = 6,5. Končno smo produkt liofilizirali, stehtali in analizirali na N po Kjeldahlu in suho snov. Izračun masne bilance je prikazan v tabeli 3.1.

25. 11. 92

- 57 -

Tabela 3.1 Izračun masne bilance tradicionalnega izoelektričnega obarjanja za proizvodnjo sojinega proteinskega izolata.

Operacije in frakcije	Masa frakcije g	Protein %(Nx6,25)	Suha snov %	Dobitek sn proteina %	Dobitek suhe snovi %
Ekstrakcija: Sojina moka	425,8	55,2	94,0	100,0	100,0
Voda	3574,2	0	0	0	0
4 N NaOH	20,1	0	16,0	0	0,8
1. centrifugiranje: Σ	4020,1	5,9	10,0	100,9	100,4
Centrifugat I	3141,0	4,4	6,9	58,8	54,1
Oborina I	805,0	-	-	-	-
Ponovna ekstrakcija:					
Oborina I	805,0	-	-	-	-
Voda	3195,0	0	0	0	0
2. centrifugiranje:					
Centrifugat II	3104,0	0,5	0,9	6,6	7,0
Oborina II	820,0	9,1	17,2	31,7	35,2
Mešanje in nekisanje:					
Centrifugata I + II	6245,0	-	-	-	-
6 N HCl	45,0	0	21,3	0	2,4
3. centrifugiranje: Σ	6290,0				
Centrifugat III	5650,0	0,3	1,9	7,2	26,8
Oborina III	308,0	-	-	-	-
Spiranje:					
Oborina III	308,0	-	-	-	-
Voda	3141,0	0	0	0	0
4. centrifugiranje: Σ	3449,0				
Centrifugat IV	3113,0	0,04	0,15	0,5	1,2
Oborina IV	291,0	-	-	-	-
Neutralizacija:					
Oborina IV	291,0	-	-	-	-
Voda	1550,0	0	0	0	0
4 N NaOH	17,0	0	16,0	0	0,7
Sušenje: Frah	128,0	93,8	96,3	51,1	30,8

25. 11. 92

- 58 -

B. Izoelektrično spiranje za proizvodnjo sojinega
proteinskega koncentrata

425,6 g sojine moke (Sojamel 13, proizvajalec Aarhus Oliefabrik A/S) smo sprali v 3574 g vode s 50°C. S 44,8 g 6 N HCl smo pH uravnali na 4,5. Spiranje smo izvajali 4 ure z mešanjem. Goščo smo nato centrifugirali pri 3000 x g 15 minut v laboratorijski centrifugi (Beckman Model J-6B), pri čemer smo uporabili 4 enolitrske čaše. Centrifugat I smo stehali in analizirali na N po Kjeldahlu in suho snov. Trdno fazo I smo stehali in ponovno sprali z vodo do skupne mase 4000 g. Z 1,7 g 6 N HCl smo pH ponovno uravnali na 4,5 in goščo mešali še 30 minut pri 50°C. Kot zgoraj smo izvedli centrifugiranje in tehtanje centrifugata II in trdnih snovi II. Trdno fazo II smo ponovno suspendirali v 1575 g H₂O s 50°C in s 34,5 g 4 N NaOH smo pH uravnali na 6,5. Zmes smo mešali pri 50°C še 1 uro in po potrebi ponovno uravnali na pH = 6,5. Končno smo proteinski produkt liofilizirali, stehali in analizirali na N po Kjeldahlu in suho snov. Masna bilanca je prikazana v tabeli 3.2.

Tabela 3.2 Izračun masne bilance izoelektričnega spiranja
za proizvodnjo sojinega proteinskega koncentrata

Operacije in frakcije	Masa frakcije g	Protein %(Nx6,25)	Suha snov %	Dobitek proteina %	Dobitek suhe snovi %
Spiranje:					
Sojina moka	425,8	55,2	94,0	100,0	100,0
Voda	3574,0	0	0	0	0
6 N HCl	44,8	0	21,3	0	2,4
1. centrifugiranje: Σ					
Centrifugat I	3150,0	0,6	3,2	8,0	25,2
Trdne snovi I	846,0	-	-	-	-
Ponovno spiranje:					
Trdne snovi I	846,0	-	-	-	-
Voda	3154,0	0	0	0	0
6 N HCl	1,7	0	21,3	0	0,1
2. centrifugiranje: Σ					
Centrifugat II	3130,0	0,1	0,4	1,3	3,2
Trdne snovi II	863,0	-	-	-	-
Nevtralizacija:					
Trdne snovi II	863,0	-	-	-	-
Voda	1575,0	0	0	0	0
4 N NaOH	34,5	0	16,0	0	1,4
Sušenje: Prah					
	281,0	72,5	98,4	86,7	69,1

25. 11. 92

- 601 -

C. Izoelektrično spiranje, ki vključuje encim za solubiliziranje preostanka, za proizvodnjo p.v.p.

425,8 g sojine moke (Sojamel 13, proizvajalec Aarhus Oliefabrik A/S) smo spirali v 3524,2 g vode s 50°C. Z uporabo 43,7 g 6 N HCl smo pH uravnali na 4,5. 24 g pripravka SFS-aze KRF 68 BIII (primer 1) smo solubilizirali v 26 g vode in dodali k spiralni zmesi. Spiranje smo nato izvajali 4 ure z mešanjem. Nato smo izvedli čiščenje, kot je opisano za B, pri čemer so bili edini parametri z drugačnimi vrednostmi količine 6 N HCl, 4 N NaOH in vode za ponovno suspenziranje. Masna bilanca je prikazana v tabeli 3.3.

25. 11. 92

- 61 -

Tabela 3.3 Izračun masne bilance izoelektričnega spiranja, ki vključuje encim za solubiliziranje preostanka, za proizvodnjo p.v.p.

Operacije in frakcije	Masa frakcije g	Protein %(Nx6,25)	Suha snov %	Dobitek proteina %	Dobitek suhe snovi %
Spiranje:					
Sojina moka	425,8	55,2	94,0	100,0	100,0
Voda	3540,2	0	0	0	0
6 N HCl	43,7	0	21,3	0	2,3
SFS-aza:KRF 68 BIII	24,0	75,3	96,0	7,7	5,8
1. centrifugiranje: Σ					
Centrifugat I	3420,0	1,7	5,2	24,7	44,4
Trdne snovi I	620,0	-	-	-	-
Ponovno spiranje:					
Trdne snovi I	620,0	-	-	-	-
Voda	3380,0	0	0	0	0
6 N HCl	1,3	0	21,3	0	0,1
2. Centrifugiranje: Σ					
Centrifugat II	3400,0	0,2	0,6	2,9	5,1
Trdne snovi II	577,0	-	-	-	-
Nevtralizacija:					
Trdne snovi II	577,0	-	-	-	-
Voda	1700,0	0	0	0	0
4 N NaOH	25,3	0	16,0	0	1,0
Sušenje: Prah					
	211,0	87,3 ¹⁾	96,7 ¹⁾	78,2	51,1
		86,9 ¹⁾	97,0 ²⁾		

1) Analizirano v Bioteknisk Institut, Holbergsvej 10, DK-6000 Kolding, Danska

2) Analizirano v Qvist's Laboratorium, Marselis Boulevard 169, DK-8000, Aarhus C, Danska

Hranilne lastnosti

Določili smo sestave amino kislin treh proteinskih produktov, glej tabelo 3.4. Ob uporabi referenčnega vzorca FAO iz leta 1957 izračunamo celotni delež esencialnih amino kislin, kemično vrednost in indeks esencialnih amino kislin (EAAI).

Delež inhibitorja tripsina v vseh treh produktih smo določili s pomočjo metode, opisane v A.O.C.S. Tentative Method Ba 12 - 75 (A.O.C.S. je okrajšava za American Oil Chemists' Society). Rezultati so prikazani v tabeli 3.5, ki vključuje tudi dobitke in razmerje protein/suha snov vseh treh produktov.

2 5. 11. 92

- 63 -

Tabela 3.4 Sestava amino kislin in ocena hranljivosti
treh proteinskih produktov A, B in C.

Amino kislina	A. Sojin protein- ski izolat		B. Sojin protein- ski koncentrat		C. Sojin proteinski izolat (p.v.p.)	
	g/16 g N	aas ¹⁾	g/16 g N	aas ¹⁾	g/16 g N	aas ¹⁾
Ne-esencialne						
Aspartinska kislina	12,4	-	11,3	-	11,9	-
Serin	4,62	-	4,69	-	4,81	-
Glutaminska kislina	21,3	-	18,2	-	17,7	-
Prolin	6,07	-	5,19	-	4,76	-
Glicin	4,13	-	4,26	-	4,33	-
Alanin	3,54	-	4,27	-	4,55	-
Histidin	2,83	-	2,78	-	2,50	-
Arginin	8,09	-	7,57	-	7,04	-
Esencialne						
Izolevcin	4,87	> 100	4,97	> 100	5,19	> 100
Levcin	7,80	> 100	7,98	> 100	8,09	> 100
Lizin	6,24	> 100	6,09	> 100	5,57	> 100
Fenilalanin	5,47	> 100	5,35	> 100	5,17	> 100
Tirozin	3,38	> 100	3,88	> 100	4,44	> 100
Cistin	1,29	64,5	1,32	66,0	1,44	72,0
Metionin	1,08	49,1	1,21	55,0	1,31	59,5
Treonin	3,10	> 100	3,60	> 100	3,97	> 100
Triptofan	1,06	75,7	1,37	97,9	1,32	94,3
Valin	4,90	> 100	5,23	> 100	5,57	> 100
% celotnega de- leža esencial- nih amino kislin	38,36		41,31		42,21	
Kemična vrednost	56,4%		60,2%		65,5%	
EAAI	86,7%		90,2%		91,3%	

1) aas = vrednost amino kislin, ki temelji na referenčnem vzorcu
FAO (1957)

25. 11. 92

- 64 -

Tabela 3.5 Procesne karakteristike in delež inhibitorja tripsina treh proteinskih produktov A, B in C.

		A. Sojin protein- ski izolat	B. Sojin protein- ski koncentrat	C. Sojin pro- teinski izo- lat (p.v.p.)
Procesne karakte- ristike	Protein iz suhe snovi	97,4 %	73,7 %	90,0 %
	Dobitek proteina	51,1 %	86,7 %	78,2 %
Inhibitorji tripsina TUI/g produkta		34.000	21.000	19.000
TUI/g proteina		36.250	28.970	21.810

Funkcionalne lastnosti

Indeks topnosti dušika (NSI) smo določili v 1 %-ni disperziji proteina pri pH = 7,0 v 0,2 M NaCl oz. v destilirani vodi. Po 45 minutah mešanja z magnetnim mešalom smo suspenzijo centrifugirali pri 4000 x g 30 minut in supernatant analizirali na dušik. Topnost dušika smo izračunali kot (topni N %/celotni N %). Rezultati tega ovrednotenja vseh treh produktov so prikazani v tabeli 3.6.

Emulgirno sposobnost smo določili z rahlo modificirano Swiftovo titracijo pri vsakem produktu po trikrat. 4,0 g (N x 6,25) produkta smo zmešali s Sorval Omnimixerjem pri majhni hitrosti v 250 ml 0,5 M NaCl. 50 ml suspenzije smo prenesli v steklen mešalni kozarec in dodali 50 ml sojinega olja. Nato smo celotno zmes stehali. Zmes olja in vode smo nato homogenizirali pri 10000 vrt/min, pri čemer je bil kozarec v ledni kopeli. Nato smo s hitrostjo 0,3 ml/sek. dodajali dodatno količino sojinega olja, dokler se emulzija ni sesedla. Celotno količino olja, dodanega pred "končno točko", smo ugotovili s tehtanjem.

Emulgirno sposobnost smo izračunali kot ml olja na gram proteina (N x 6,25). Gostoto olja smo vzeli kot 0,9 g/ml.

Povprečni rezultati določevanja emulgirne sposobnosti treh produktov so prikazani v tabeli 3.6.

Ekspanzijo pri stepanju smo določili v 3 %-ni raztopini proteina pri pH = 6,5. 250 ml vodne disperzije vzorcev proteina smo stepali s hitrostjo III 4 minute v mešalniku Hobart (model N-50) z montirano žično metlico. Ekspanzijo pri stepanju smo izračunali v skladu s formulo

$$\text{ekspanzija pri stepanju} = \frac{V-250}{250} \times 100 \%,$$

kjer je V končni stepeni volumen v ml.

V smo izmerili tako, da smo mešalni kozarec ponovno napolnili z vodo. Za vsakega od treh vzorcev smo izvedli po dve določitvi. Povprečni rezultati so prikazani v tabeli 3.6.

Obstojnost pene smo določili kot razmerje med količino pene, ki preostane po 30 minutni drenaži, in prvotno količino pene. A gramov pene, proizvedene z gornjo metodo, smo dali v valj iz umetne snovi (premer 7 cm, višina 9 cm) z žično mrežo z velikostjo zank 1 mm x 1 mm. Valj smo dali na lij na vrhu steklenega valja in določili maso (B) odtekle tekočine v steklenem valju. Obstojnost pene FS je definirana z enačbo

$$FS = \frac{A - B}{A} \times 100 \%$$

Rezultati določevanja so prikazani v tabeli

3.6.

Trdnost gela je v tem opisu definirana kot viskoznost po Brookfieldu, merjena s T-vreteni na stojalu Brookfield Helipath. Gele smo pripravili s toplotno obdelavo 12 %-ne suspenzije proteina v 0,5 M NaCl. Toplotno obdelavo smo izvedli v zaprtih pločevinkah s premerom 7,3 cm in višino 5,0 cm, ki smo jih dali v vodno kopel, ki smo jo vzdrževali pri 80 °C in 100 °C, vsakokrat po 30 minut. Pločevinke smo ohladili in termostatirali na 20 °C, predno smo jih odprli in merili. Rezultati meritev so prikazani v tabeli 3.6.

Tabela 3.6 Funkcionalne lastnosti treh proteinskih produktov A, B in C.

Funkcionalnost	A. Sojin proteinski izolat	B. Sojin proteinski koncentrat	C. Sojin proteinski izolat (p.v.p.)
% NSI v 0,2 M NaCl	39,5	20,3	25,6
% NSI v vodi	53,9	25,1	28,6
Emulzijska sposobnost: ml olja/g (N x 6,25)	218	182	354
Ekspanzija pri stepanju %	120	120	340
Obstojnost pene %	50	50	20
Trdnost gela; [Pa.s]			
80 °C (0,5 M NaCl)	$1,7 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$	3,3
100 °C (0,5 M NaCl)	$2,0 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$

25. 11. 92

- 68 -

PRIMER 4 (primer uporabe)

Pripravili smo p.v.p. v skladu z načinom dela, opisanim v primeru 3C, le da je aktivnost celulaze izvirla deloma iz *Trichoderma reesei*. Tržni pripravek celulaze CELLUCLAST, ki jo proizvaja Novo Industri A/S, smo obdelali z bazo pri nizki temperaturi na sledeči način. pH vrednost 10 %-ne raztopine CELLUCLAST-a v vodi smo uravnali z NaOH na 9,2 in tako dobljeno raztopino ohladili na 5 °C. Po 1 uri pri tem pH in tej temperaturi smo pH ponovno uravnali z 20 %-no očetno kislino na 4,7. To raztopino smo hranili preko noči pri 5 °C in nato sterilno filtrirali. Filtrat smo liofilizirali. 4 g liofiliziranega produkta smo dali k pripravku SPS-aze KRF 68 BIII (primer 1). Oba encima smo solubilizirali v 172 g vode, predno smo ju dodali k izpiralni zmesi. Določitve masne bilance tega primera so prikazane v tabeli 4.1.

Poskus dokazuje, da ta posebni pripravek SPS-aze že vsebuje učinkovito celulazo, saj dodatek CELLUCLAST-a očitno ne vpliva na razmerje protein/suha snov. Vendar pa lahko vsebujejo drugi pripravki SPS-aze, npr. KRF 92, manj celulaze; glej tabelo tik pred primerom 2.

Tabela 4.1 Določitve masne bilance izo-električnega spiranja, ki vključuje pripravek SPS-aze in CELLUCLAST[®], za proizvodnjo p.v.p.

Operacije in frakcije	Masa frakcije gram	Protein % (N x 6,25)	Suha snov %	Dobitek proteina %	Dobitek suhe snovi %
Spiranje:					
Sojina moka	425,8	55,2	94,0	100,0	100,0
Voda	3546,2	0	0	0	0
6 N HCl	43,1	0	21,3	0	2,3
SPS-aza: KRF-68-B-III	24,0	75,3	96	7,7	5,8
CELLUCLAST	4,0	43,6	96	0,7	1,0
Centrifugi- ranje: Σ	4043,1	-	-	-	-
Centrifugat I	3382,0	1,9	5,5	27,3	46,5
Trdne snovi I	661,0	-	-	-	-
Ponovno spiranje:					
Trdne snovi I	661,0	-	-	-	-
Voda	3339,0	0	0	0	0
6 N HCl	0	0	0	0	0
2.centrifugi- giranje: Σ	4000,0	-	-	-	-
Centrifugat II	3414,0	0,2	0,7	2,9	6,0
Trdne snovi II	582,0	-	-	-	-

Nadaljevanje tabele 4.1

Nevtralizacija:

Trdne snovi II	582,0	-	-	-	-
Voda	1691,0	0	0	0	0
4 N NaOH	25,3	0	16,0	0	1,0

Sušenje:

Prah	206,0	88,8	98,9	77,8	50,9
------	-------	------	------	------	------

PRIMER 5 (primer uporabe)

Pripravili smo p.v.p. v skladu z metodo, opisano v primeru 3.C, le da smo vse mase zmanjšali za faktor 5 in da smo reakcijsko zmes pred centrifugiranjem ohladili na okoli 5 °C. Na osnovi analiznih rezultatov v primerjavi s centrifugatoma smo dobili teoretski dobitok oborjenega proteina, kot je prikazano v tabeli 5.1.

Tabela 5.1. Teoretski dobitki proteina, doseženi pri proizvodnji p.v.p.

Frakcije	Masa g	Protein (N x 6,25) %	Dobitek pro- teina %	Primer 3 C	
				Protein (N x 6,25) %	Dobitek proteina, %
Sojina moka	85,2	55,2	100	55,2	100
SPS-aza KRF-68-B-III	4,8	75,3	7,7	75,3	7,7
1. centrifugat	639	0,99	13,5	1,7	24,7
2. centrifugat	595	0,13	1,6	0,2	2,9
p.v.p.	-	87,2 ^a	92,6 ^b	87,1	80,1 ^b

25. 11. 92

- 772 -

- a) Povprečje iz 87,5 (Bioteknisk Institut) in 86,9 (Qvist's Laboratorium); suha snov je 97,6 oz. 98,0 %,
- b) Izračunano kot celotna masa proteina - protein, izgubljen v centrifugatih.

PRIMER 6 (primer uporabe)

Dokaz vezave proteina na SPS

40 g (N x 6,25) tržnega sojinega proteinskega izolata (Purina 500 E firme Ralston Purina) smo raztopili v 680 g vode. Zmes smo segreli v vodni kopeli na 50 °C in pH uravnali s 6 N HCl na 4,50. 90 g te zmesi smo prenesli v pet 250 ml Erlenmeyerjevih buč in dodali po 0 g, 0,2 g, 0,4 g, 0,8 g, oz. 1,6 g SPS, proizvedenega, kot smo opisali prej v tem opisu. Buče smo nato vzdrževali ob magnetnem mešanju v vodni kopeli 240 minut pri 50 °C.

Nato smo gošče centrifugirali pri 3000 x g 15 minut in centrifugate I analizirali na N po Kjeldahlu in suho snov. Trdne faze smo sprali v vodi pri sobni temperaturi in ponovno centrifugirali. Ta postopek smo ponovili. Nato smo trdne snovi dispergirali v 50 ml vode in z dodajanjem 6 N NaOH po kapljicah uravnali pH na 6,50. Nevtralizirane produkte smo liofilizirali in analizirali na N po Kjeldahlu in suho snov. Na osnovi analize, prikazane v tabeli 6.1, smo se pomočjo formul, prikazanih v

zvezi s tablo 6.2, izračunali pridobitek proteina in odstotek SPS, ki se je vezal na protein.

Ta primer dokazuje, da je SPS trdno vezan na protein tako, da se z naraščajočim deležem SPS zmanjšuje razmerje protein/suha snov. Delež SPS, ki je primerljiv z okoli 0,4 g v 10 ml vode, dodan k 5 g proteinskega izolata, je razmerje protein/SPS, prisotno v sojini moki.

% vezave SPS je izračunana vrednost. % vezave SPS se zaradi nasičenja proteina glede na SPS pri majhnih razmerjih protein/SPS zmanjšuje.

Tabela 6.1 Meritve v skladu s primerom 6

Razmerje protein/SPS	Centrifugati I		Posušena oborina			
	% N	% suhe snovi	% N	% N x 6,25	% suhe snovi	$\frac{N \times 6,25}{\text{suha snov}}$
∞	0,068	0,62	13,2	82,5	93,1	88,6
25	0,045	0,49	13,4	83,8	97,3	86,1
12,5	0,038	0,45	13,0	81,3	97,9	83,0
6,25	0,031	0,45	12,6	78,8	98,1	80,3
3,125	0,026	0,61	11,8	73,8	97,9	75,3

Tabela 6.2 Pridobitek proteina in % vezave SPS

Razmerje protein/SPS	% pridobitka proteina ¹⁾	% vezave SPS ²⁾
∞	91,5	0
25	94,4	77
12,5	95,3	90
6,25	96,1	70
3,125	96,8	60

1) % pridobitka proteina = $\left[1 - \frac{NC \ 1 \times 6,25}{5} \right] \times 100$, kjer je
 NC 1 = % N v centrifugatu I

2) % vezave SPS =

$$\frac{\left[\frac{5 \times (\% \text{ pridobitka proteina})}{(\% P/H)} - \frac{5 \times (\% \text{ pridobitka proteina})}{(\% P/H)_{\infty}} \right]}{[5/\text{razmerje SPS}]} \times 100,$$

kjer je

(% P/H) razmerje protein/suha snov v sušeni oborini in

(% P/H) ∞ je za oborino brez dodatka SPS.

PRIMER 7 (primer uporabe)

Ta primer opisuje proizvodnjo p.v.p. ob uporabi pripravka SPS-aze KRF 92 B-I v dozi 5 % suhe snovi. Način proizvodnje je bil natančno tak kot v primeru 3 C, le da smo vse mase zmanjšali za faktor 5. P.v.p. smo analizirali, kot je opisano v primeru 2. Rezultati, dobljeni v poskusu, so razvidni iz tabele 7.1.

Tabela 7.1 Rezultati, dobljeni v primeru 7

Sestavina	Masa g	(N x 6,25) %	Suha snov %	Dobitek proteina, %	Dobitek suhe snovi, %
Sojina moka	85,2	55,2	94,0	100	100
Encimski pri- pravek	4,0	71,2	-	6,1	-
1. centrifuga- gat	632	1,88	5,44	25,3	43,0
2. centrifuga- gat	673	0,30	0,80	4,3	6,7
p.v.p.	39,8	85,6 ^a 84,4 ^b	98,1 ^a 98,1 ^b	71,9	48,8

^a Analiziramo v Bioteknisk Institut, Holbergsvej 10, DK-6000 Kolding

^b Analiziramo v Qvist's Laboratorium, Marselis Boulevard 169, DK-8000 Aarhus C

25. 11. 92

- 75 -

PRIMER 8 (primer uporabe)

Ta primer dokazuje učinek predhodne obdelave sojine moke s kuhanjem v parnem ejektorju pred proizvodnjo p.v.p.

Predhodna obdelava

Goščo sojine moke v vodi, ki vsebuje 10 kg sojine moke (Sojamel 13, proizvajalec Aarhus Oliefabrik A/S) na 100 kg, smo črpali skozi parni ejektor (tip Hydroheater B-300) in zmešali s paro z 8 bari v taki količini in s takim pretokom, da smo končno temperaturo 150 °C lahko vzdrževali v cevnem tlačnem reaktorju 25 sekund. Nato smo v dekompresijski komori (ciklonu) tlak zmanjšali in od tam goščo poslali skozi ploščni menjalnik toplote in jo ohladili na okoli 50 °C. Ohlajeno goščo bi lahko uporabili v skladu z izumom direktno za proizvodnjo p.v.p., toda v tem primeru smo goščo razpršilno posušili pri vstopni temperaturi 200 °C in izstopni temperaturi 90 °C. Ugotovili smo, da ima predhodno obdelani produkt delež suhe snovi 96,5 % in delež proteina 56,9 % (N x 6,25).

Priprava p.v.p.

To pripravo smo izvedli na sledeči način:

70 g suhe snovi v parnem ejektorju kuhane in posušene sojine moke smo suspendirali in mešali pri 50 °C v 560 g vode in s pomočjo 6,5 ml 6 N HCl pH uravnali na 4,50. 6 x 90 g te suspenzije smo prenesli v šest 250 ml Erlenmeyerjevih buč in

25. 11. 92

- 76 -

mešali na vodni kopeli s 50 °C s pomočjo magnetnih mešal. V vsako bučo smo dali 10 g raztopine, ki je vsebovala po 0 g, 0,025 g, 0,050 g, 0,10 g, 0,20 g oz. 0,40 g pripravka SPS-aze KRF-68-B-III. Reakcijske zmesi smo nato mešali 240 minut pri 50 °C. Nato smo izvedli 15 minutno centrifugiranje pri 3000 x g.

Supernatant smo nato analizirali na N po Kjeldahlu in trdno fazo sprali z vodo ob enakih volumnih in centrifugirali. Ta postopek smo izvedli dvakrat. Trdno fazo smo nato liofilizirali in analizirali na N po Kjeldahlu in suho snov.

Podoben poskus smo izvedli z neobdelano sojino moko (Sojamel 13, proizvajalec Aarhus Oliefabrik A/S) kot izhodnim materialom. V tem primeru so bila razmerja encim/substrat 0, 1 %, 2 %, 3 %, 4 % in 8 %.

Na osnovi deleža proteina v supernatantih lahko izračunamo odstotke pridobljenega proteina. Dobitek proteina temelji na domnevi, da je encimski produkt po reakciji 100 %-no solubiliziran. Spodnja tabela kaže rezultate, dobljene v obeh poskusih.

Tabela 8.1 Dobitki proteina in razmerje protein/suha snov
za p.v.p., pripravljen iz kuhane ali surove sojine
moke

E/S %	Kuhana sojina moka		Neobdelana sojina moka	
	Dobitek proteina %	Protein v suhi snovi %	Dobitek proteina %	Protein v suhi snovi %
0	92,9	76,5	90,7 m	73,9
0,25	90,1	86,6	-	-
0,50	89,3	88,7	-	-
1,0	88,1	89,7	87,1	86,2
2,0	86,6	91,7	85,7	88,1
3,0	-	-	84,3	89,5
4,0	84,7	92,2	82,6	90,9
8,0	-	-	76,2	91,1

Tako glede na postopke ekstrakcije (izolacije) za materiale, ki niso proteini, kot tudi glede na postopke utekočinjenja in njim sorodne postopke, se sklicujemo na splošno procesno shemo za uporabe, kot je prikazana na tehnološki shemi št. 3.

Substrat je lahko en ali več ogljikovih hidratov, prisotnih v surovini, ali pa je lahko celotna surovina.

Ta substrat lahko podvržemo predhodni obdelavi kemijskega ali fizikalnega značaja, kot je kasneje prikazano s primeri, npr. kisli ali alkalni obdelavi, namakanju ali prepajanju in/ali kuhanju s paro ali brez nje.

Surovino lahko maceriramo, zrežemo, mokro meljemo in/ali homogeniziramo (vse te obdelave so v tehnološki shemi št. 3 označene kot homogenizacija), z dodatki vode ali brez njih, in med to stopnjo lahko dodamo druge dodatke. Homogenizacijo lahko izvedemo z različnimi učinkovitostmi, npr. drugačnimi tlaki, ki so samo del maksimalnega tlaka, navedenega za določeni uporabljeni homogenizator. Pred ali med homogenizacijo lahko dodamo različne dodatke, kot je predstavljeno v tehnološki shemi št. 3 s pomočjo simbolov b_1 , b_2 , ... b_n .

Reakcijski postopek, ki vključuje pripravek SPS-aze, izvedemo pri natančno navedenih pogojih, npr. pri temperaturi, tlaku, času, pH in dozah encima; tudi napotki glede uporabljenega reaktorja (npr. šaržno, čepno strujanje) in mešanja, če je potrebno, so koristni. Za različne surovine lahko

25. 11. 92

- 29 -

dodamo niz dodatkov, navedenih v tehnološki shemi št. 3 kot $c_1, c_2 \dots c_n$.

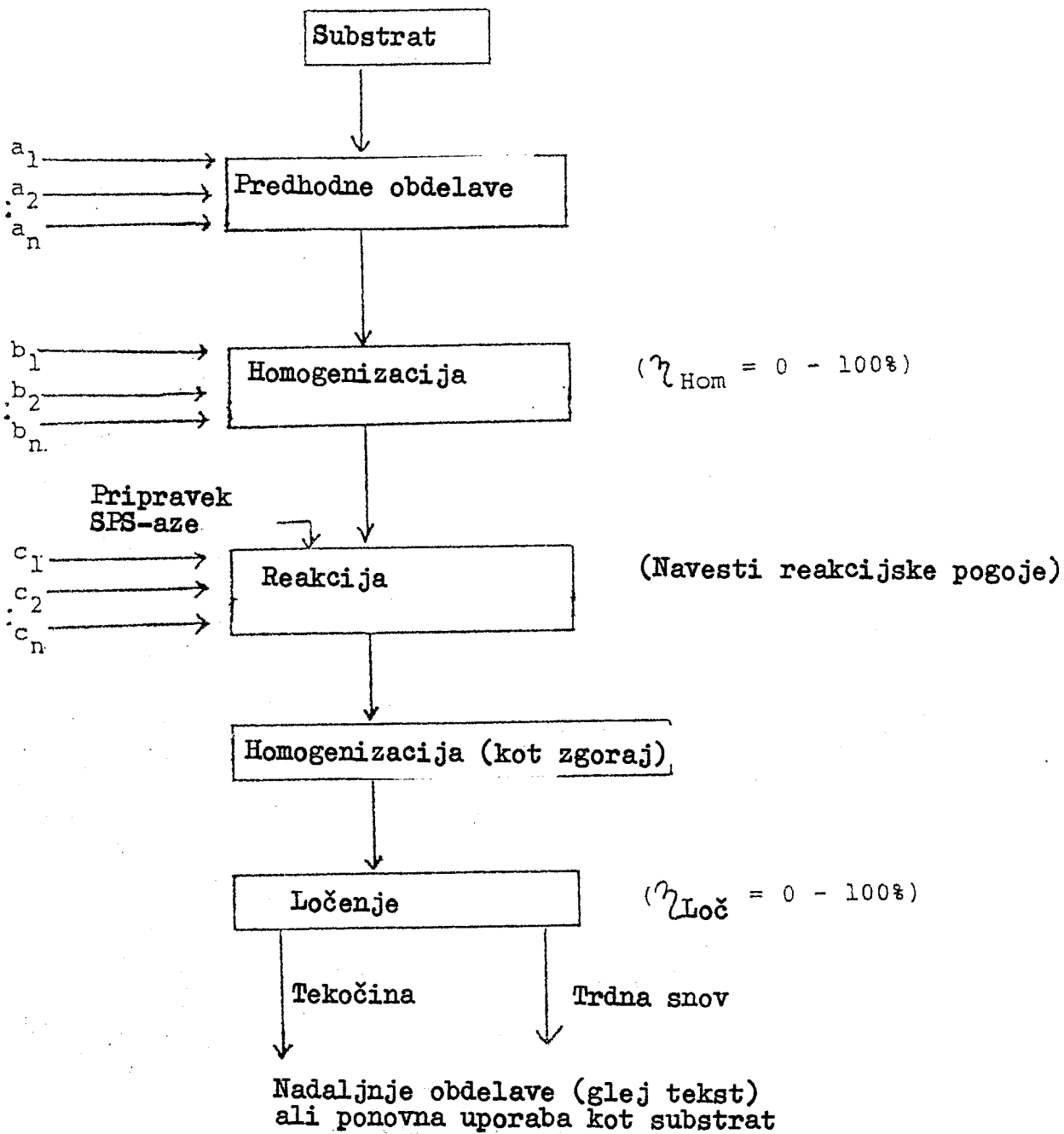
Tudi postopke ločenja lahko izvedemo z različnimi učinkovitostmi. Med mnogimi postopki ločenje odpade ali je olajšano, npr. če je surovina popolnoma utekočinjena. Uporabimo lahko različne priprave za ločenje (npr. centrifuge, filtre, opremo za ultrafiltriranje, hidrociklone, zgoščevalnike, sita ali mreže ali preproste dekantatorje).

Učinkovitost ločenja je definirana kot razmerje med absolutnim deležem gošče v trdni fazi in absolutnim deležem gošče v reakcijski zmesi.

Dobljene tekoče ali trdne faze lahko obdelamo še dalje, npr. koncentriramo, posušimo ali solventno ekstrahiramo, da odstranimo določene sestavine, kot maščobo ali olje, fermentiramo za proizvodnjo biomase, alkohola ali drugih produktov (encimov, antibiotikov ali drugih dragocenih sestavin).

Dobljene produkte lahko tudi vračamo v ponovno obdelavo po shemi postopka.

Tehnološka shema št. 3



V nadaljevanju podajamo nekaj primerov uporab pripravkov SPS-aze in pregled teh uporab je razviden iz sledečega seznama.

V priloženi tabeli I so navedene tudi določene značilnosti v zvezi s tehnološko shemo št. 3.

Seznam s primeri prikazanih uporab pripravkov SPS-aze

Vrsta pripravka SPS-aze	Referenca št.		
Pripravek SPS-aze, ki je v bistvu brez ene ali več nezaže- lenih encimskih aktivnosti	A 1	Ekstrakcija škroba iz koru- ze, pšenice in krompirja	
	A 2	Ekstrakcija lipidov iz rast- linskega materiala	
	A 3	Ekstrakcija eteričnih olj iz rastlinskih materialov	
	A 4	Ekstrakcija naravnih barvil iz rastlinskega materiala	
	A 5	Ekstrakcija kavčuka iz grma guayule (Parthenium argenta- tum)	
Nemo- difi- cirani pri- pravki SPS-aze	Popolno uteko- činjenje ali podobna obde- lava	Ba 1	Proizvodnja mlečnega nado- mestka za domače živali
		Ba 2	Proizvodnja surovin, ki vse- bujejo saharificiran škrob
		Ba 3	Popolno utekočinjenje hrušk in drugega sadja
		Ba 4	Proizvodnja soka z obdelavo sadja in sočivja
		Ba 5	Obdelava v zvezi z ekstrakcij ali stiskanjem sladkornega trsa ali sladkorne pese
		Ba 6	Proizvodnja sojinega mleka
		Ba 7	Obdelava za povečanje koli- čine topnih snovi v kavi, ki se daje pridobiti
Predelovalni pripomočki	Predelovalni pripomočki	Bb 1	Preprečenje in/ali razgrad- nja jabolčne motnosti
		Bb 2	Uporaba kot bistrično sred- stvo za belo vino
		Bb 3	Proizvodnja ISSPH ali drugih rastlinskih proteinskih hi- drolizatov
		Bb 4	Encim za žontanje v pivo- varništvu
		Bb 5	Encimski dodatek za uporabo med fermentacijo in/ali skladiščenjem piva
		Bb 6	Sredstvo za luščenje mandljev

25. 11. 92

- 83 -

nadaljevanje

Druge uporabe	Bc 1	Razgradnja različnih odpadnih materialov
	Bc 2	Saharifikacija in istočasna fermentacija
	Bc 3	Razgradnja celuloze
	Bc 4	Uporaba kot pripomoček pri peki
	Bc 5	Izboljšanje dobitka alkohola in dobitka biomase med fermentacijo sulfitne lužnice iz proizvodnje papirja
	Bc 6	Odstranjevanje vode iz bioloških muljastih produktov
	Bc 7	Pripomoček za siliranje

TABELA I

Ref.	Substrat	Dodatki			1. homogenizacija η_{Hom} %	2. homogenizacija η_{Hom} %	Ločenje $\eta_{Loč}$ %	Tekoča faza	Nadaljnje obdelave	
		a _i	b _i	c _i					Trdna faza	Združena faza (brez ločenja)
A 1	koruza	voda SO ₂	voda	NaOH ali HCl	20 - 50	10 - 30	30 - 50	(vsebuje kličke) spiranje, pridobivanje olja	operacije spiranja	-
A 2	koruzni klički	-	-	NaOH ali HCl	0	0	100	(olja + voda) čiščenje	(odpadek)	-
Ba 1	sojina moka (razmaščena)	voda	-	HCl	0	0	0	-	-	pasterizacija, koncentriranje, razpršilno sušenje
Ba 2	sladki krompir	voda	Termyl	NaOH ali HCl	-	-	0	-	-	kvas za alkoholno fermentacijo, destilacija
Ba 5	sladkor-na pesa	voda	-	NaOH ali HCl	10 %	-	100	kristalizacija	(odpadek)	-
Bc 1	tofu ali preostanek sojinega mleka	voda	-	HCl	10 %	-	0	-	-	kvas za alkoholno fermentacijo, destilacija

A 1. Ekstrakcija škroba iz koruze, pšenice in krompirja

Ekstrakcijo škroba iz koruze, pšenice, krompirja in drugih rastlin, ki vsebujejo škrob, izvedemo z enim ali z več izmed sledečih ukrepov: namakanje, mokro mletje in ločenje. Uporaba pripravka SPS-aze, ki je v bistvu brez amilolitske aktivnosti, bo zagotovila sledeče prednosti, pri čemer uporabljamo kot primer koruzo:

1. Sproščanje škroba bo olajšano med krajšim namakalnim časom.
2. Porabo vode lahko zmanjšamo.
3. Sproščanje koruznih kličkov bo olajšano brez sproščanja olja koruznih kličkov.
4. Protein lahko dobimo z večjo čistoto.
5. Ponovno pridobivanje koruzne namakalne vode bo olajšano.

A 2. Ekstrakcija lipidov iz rastlinskega materiala

Ker so lipidi v rastlinskem materialu zaprti v notranjosti celic in običajno vezani na proteine, lahko ekstrahiramo lipide v vodni fazi z obdelavo s pripravkom SPS-aze, ki je v bistvu brez lipaz. Tako običajno izoliramo olje koruznih kličkov z ekstrakcijo posušenih koruznih kličkov s heksanom. Vendar pa je operacija sušenja nepotrebna, če obdelamo mokre koruzne kličke s pripravkom SPS-aze zgoraj navedene vrste. Podobno lahko izboljšamo

ekstrakcijo olivnega olja v vodni fazi, če je encim, ki ga uporabljamo za encimsko obdelavo, pripravek SPS-aze zgoraj navedene vrste, glej npr. Food, Pharmaceutical and Bioengineering, No. 172, vol. 74, str. 93 - 94. Na podoben način lahko izboljšamo tudi vodne ekstrakcije npr. sojinega olja, repičnega olja in sončničnega olja.

A 3. Ekstrakcija eteričnih olj iz rastlinskih materialov

Če ekstrahiramo rastlinske materiale, ki vsebujejo eterična olja, z vodno raztopino pripravka SPS-aze, ki je v bistvu brez encimske aktivnosti, sposobne, da razgradi ali drugače spremeni eterična olja, bomo pridobili eterična olja z velikimi dobitki ob zelo majhnih stroških.

A 4. Ekstrakcija naravnih barvil iz rastlinskega materiala

Če obdelamo rastlinske materiale, ki vsebujejo barvila, npr. peso, ki vsebuje rdeče barvilo betanin, ali barvilo v brusnicah, s pripravkom SPS-aze, ki je v bistvu brez encimskih aktivnosti, sposobnih, da razgrade ali drugače spremenijo barvila, bomo pridobili barvila z velikimi dobitki in ob zelo majhnih stroških.

A 5. Ekstrakcija kavčuka iz grma guayule

Drugi primer substrata za pripravek SPS-aze, ki je v bistvu brez encimske aktivnosti, sposobne, da razkroji naravni kavčuk, je material iz celičnih sten v koreninah in vejah grma guayule.

Ba 1. Proizvodnja mlečnega nadomestka za domače živali,
prednostno mlečnega nadomestka za teleta

S popolnim utekočinjenjem soje, sončničnega semena, bombaževčevega semena, boba ali graha v vodnem mediju lahko proizvedemo mlečni nadomestek za teleta, ki je topen v mrzli vodi pri pH vrednosti okoli 4,5. Pri uporabi surovin, ki vsebujejo škrob, kot boba ali graha, je treba izvesti utekočinjenje škroba s pomočjo α -amilaze pred, po ali istočasno z obdelavo z SPS-azo, ki končno solubilizira neškrobne polisaharide, ki so prisotni kot ogrodni material v celičnih stenah. Niže je prikazan podroben primer ob uporabi boba, kar pa se tiče soje, se sklicujemo na tabelo I. Predhodna obdelava te soje je lahko prednostno kuhanje v parnem ejektorju, kar izboljša solubilizacijo preostanka.

PRIMER Ba 1.1

15 kg bobove moke (Farine de Feves firme GRANDES MINOTERIES A FEVES DE FRANCE, Pariz) smo suspendirali v 35 l vode. Dodali smo 75 g Termamyla 60 L in 18 g CaCl_2 . Suspenzijo smo ob uporabi posode s parnim plaščem med mešanjem segreli na 95 °C. Suspenzijo smo nato obdelovali pri tej temperaturi 60 minut. Nato smo pH uravnali na pH 4,5 in produkt ohladili na 50 °C. 300 g pripravka SPS-aze KRF 68 smo solubilizirali v 1 l vode in dodali. Presnovo smo

izvajali 440 minut. Če vključimo 10 g Fungamyla 800 L, se bo škrobna frakcija pretvorila v glavnem v disaharid (maltozo). Nato smo reakcijsko zmes pasterizirali 2 minuti pri 90 °C. Alikvotni del produkta smo nato liofilizirali in uporabili za teste stabilnosti. Vzorec smo nato solubilizirali pri 10 % suhe snovi in raztopino produkta smo lahko obdržali stabilno brez sedimentacije več dni.

Staljeno maščobo ali olje lahko zlahka emulgiramo v produkt, s čimer dobimo končni sestavek, ki je zelo podoben kravjemu mleku. Tudi emulzijo, ki vsebuje 3,5 % olja (sojinega olja), lahko zlahka obdržimo stabilno brez sedimentacije več dni.

PRIMER Ba 1.2

Sojino moko (Sojamel 13) smo kuhali v parnem ejektorju pri 150 °C 25 sekund, kot je opisano v primeru 8. V parnem ejektorju skuhanu sojino moko smo razpršilno posušili in uporabili za nadaljnja preučevanja, opisana v nadaljevanju.

A

50 g v parnem ejektorju kuhane sojine moke smo zmešali s 450 g vode in s 4,1 ml 6 N HCl uravnali pH na 4,5. Zmes smo nato segrevali v vodni kopeli na 45 °C in k segrevani zmesi dodali 0,250 g pripravka SPS-aze KRF-68, nato pa presnavljali med mešanjem 5 ur. Nato smo zmes toplotno obdelovali 2 minuti pri 80 °C, da smo inaktivirali encim. 100 ml vzorec smo centrifugirali pri sobni temperaturi 15 minut pri 3000 x g (g = težnost). Superna-

tant smo ionsko izmenjali in analizirali s HPLC sestavo ogljikovih hidratov. Supernatant smo analizirali tudi na N po Kjeldahlu in suho snov in izračunali indeks topnosti dušika (NSI) in indeks topnosti suhe snovi (DSI), glej rezultate v tabeli Ba I. 100 ml reakcijske zmesi, ohlajene na 20 °C, smo zlili v 100 ml merilni valj in vzdrževali pri 4 °C 2 dni. Stabilnost disperzije (%) smo izmerili tako, da smo odčitali volumen dobljenih disperzij (tabela Ba II) po 1 in 2 dneh.

K 200 ml reakcijske zmesi (pri 20 °C) smo dodali 8 g sojinega olja. Emulzijo smo pripravili z 2 minutnim mešanjem v Waring Brenderju. Stabilnost emulzije (%) smo izmerili kot zgoraj po 1 in 2 dneh.

B

Presnovo smo izvedli kot zgoraj, le da smo v tem primeru uporabili 1,00 g pripravka SPS-aze. Izvedli smo enake vrste analiz in meritev stabilnosti, kot je opisano v poglavju A. Rezultati so prikazani v tabelah Ba I in Ba II.

Iz kemijske analize supernatantov je razvidno, da so vrednosti za NSI (%) in DSI (%), dobljene pri poskusu B, večje kot pri poskusu A. Vendar pa kažejo testi stabilnosti, izvedeni z reakcijskimi zmesmi, boljše vrednost za vzorce A. Vzrok za to je verjetno večja dolžina peptidne verige proteinov v reakcijski zmesi z majhno dozo encima.

Iz sestave ogljikovih hidratov, izmerjene s HPLC, je razvidno, da nastanejo v glavnem mono- in disaharidi. Torej so oligosaharidi, za katere je znano, da so odgovorni za drisko in napenjanje, če jih dajemo teletom v prevelikih količinah, prisotni le v majhnih količinah.

Tabela Ba I Kemijske lastnosti supernatanta

Poskusi	Doza encima glede na sub- strat % m/m	NSI, % * (pri pH = 4,5)	DSI, % *** (pri pH = 4,5)	Rezultati HPLC (sestava nevtralnih sladkorjev)
A	E/S = 0,5 %	39,9	62,4	DP ₁ + DP ₂ : 79,7 % DP ₃ : 7,4 % DP ₄ : 12,2 % DP ₄₊ : 8,1 %
B	E/S = 2,0 %	57,0	67,1	DP ₁ + DP ₂ : 84,4 % DP ₃ : 6,1 % DP ₄ : 3,7 % DP ₄₊ : 5,7 %

* NSI = indeks topnosti dušika

*** DSI = indeks topnosti suhe snovi

Tabela Ba II Preizkusi stabilnosti reakcijskih zmesi

Poskusi	Doza enci- ma glede na sub- strat % m/m	Testi stabilnosti			
		Brez olja		Z oljem	
		Disperzija 1. dan	Disperzija 2. dan	Emulzija 1. dan	Emulzija 2. dan
A	E/S = 0,5 %	80 %	63 %	100 %	87 %
B	E/S = 2,0 %	66 %	35 %	85 %	71 %

Ba 2. Proizvodnja saharificiranega škroba iz surovin,
ki vsebujejo škrob

V zvezi s saharifikacijo manioka in sladkega krompirja in drugih rastlinskih materialov, ki vsebujejo škrob, je dodatek pripravka SPS-aze sposoben rešiti probleme viskoznosti. Z uporabo pripravka SPS-aze lahko pripravimo suspenzije škroba z deležem suhe snovi 25 do 30 %, po saharifikaciji pa lahko žonto fermentiramo, s čimer lahko dobimo cenen etanol.

PRIMER Ba 2.1

Na osnovi svežega in nastrganega sladkega krompirja (japonskega) smo izdelali žonto z deležem suhe snovi 24 %. Ugotovili smo, da vsebuje suha snov sladkega krompirja okoli 70 %-ni delež škroba. Predutekočinjenje s pomočjo bakterijske amilaze iz Termamyla[®] 60 L v dozi 0,5 kg/na ton škroba smo izvedli tako, da smo žonto segreli na 90°C. Žonto smo nato vzdrževali pri 90°C 30 minut. Nato smo izmerili viskoznost η_1 reakcijske zmesi s pomočjo vretena po HAAKEJU pri 90°C.

Na smo reakcijsko zmes ohladili na 55°C in pH uravnali z 2 N H₂SO₄ na pH 5,0. Nato smo z dodatkom gluko-amilaze san 1[!] (blagovna znamka firme NOVO INDUSTRI A/S) v dozi 1,75 litra/ton škroba sprožili saharifikacijo. Saharifikacijsko zmes smo nato razdelili na tri dele A, B in C, ki smo jih pred merjenjem

viskoznosti obdelovali 15 minut z encimom, kot je prikazano spodaj:

- A: Ta del je kontrola, izmerili smo viskoznost η_2 , glej tabelo Ba III.
- B: Dodali smo celulazo Tricoderma viride iz Celluclasta[®] 200 N v dozi 1 kg/tono suhe snovi sladkega krompirja. Izmerili smo viskoznost η_3 , glej tabelo Ba III.
- C: Dodali smo pripravek SPS-aze KRF-68 v dozi 0,25 kg/tono suhe snovi sladkega krompirja. Izmerili smo viskoznost η_4 , glej tabelo Ba III.

Tabela Ba III: Viskoznosti

Reakcijska zmes	Viskoznost pri 90°C	Viskoznost pri 55°C
Predutekočinjeni sladki krompir	$\eta_1 = 7,70 \times 10^{-1} \text{ Pa.s}$	$\eta_2 = 21,90 \times 10^{-1} \text{ Pa.s}$
A	-	$\eta_2 = 21,90 \times 10^{-1} \text{ Pa.s}$
B	-	$\eta_3 = 19,70 \times 10^{-1} \text{ Pa.s}$
C	-	$\eta_4 = 9,50 \times 10^{-1} \text{ Pa.s}$

Lahko torej vidimo, da lahko viskoznost reakcijske zmesi učinkovito zmanjšamo z majhno dozo SPS-aze v primerjavi s Celluclastom[®] in SAN 150.

Ba 3. Popolno utekočinjenje hrušk in drugega sadja

Če cele hruške, ki so zdrobljene mehansko, nato obdelamo s pripravkom SPS-aze, pride do popolnega utekočinjenja, in po odstranjenju manjših količin trdnih snovi nastane bister hruškov sok. Podobno metodo lahko uporabimo v zvezi z drugim podobnim sadjem, npr. jabolki.

PRIMER Ba 3.1

Sveža jabolka smo grobo zmleli s pomočjo mlina Bucher Central. Jabolčno brozgo smo nato pasterizirali v posodi z grelnim plaščem 5 minut pri 90°C in nato ohladili na temperaturo okolice. Predhodno zbrogana jabolka smo nato mleli v mlinu Fryma s korundnimi elementi, dokler brozga ni bila gladka na otip. Brozgo smo nato ponovno pasterizirali pri 80°C 10 minut in ohladili na 50°C.

Encimske presnove smo sedaj izvajali pri 50°C 30 minut, pri čemer smo istočasno vršili mešanje in merjenje viskoznosti s Contraves Rheomatom 15 (v primerjavi z odstotnim odčitkom na Rheometru pri hitrosti 13). Po končanih encimskih presnovah smo odvzeli 100 g vzorce in jih centrifugirali v graduirani epruveti pri 3000 x g 15 minut. Tako smo izmerili odstotek soka in odstotek usedline. Izmerili smo tudi pH in odstotek refraktometrične suhe snovi kot °Brixam. Tabela Ba IV kaže primerjavo med učinkom SPS-aze, kombinacije Celluclasta in SPS-aze in kombinacije Celluclasta in Pectinexa. Uporabljali smo pripravek SPS-aze KRF-68.

Tabela Ba IV Rezultati poskusov popolnega utekočinjenja
z jabolčno brozgo pri 50°C 30 minut

SPS-aza g/hl broz- ge	Celluclast [®] 200 l g/hl brozge	Pectinex [®] 3x g/hl brozge	Končna viskoz- nost %	Centrifugiran- je		Sok	
				% soka	% usedli- ne	pH	°Brix
0	0	0	100	59	41	3,8	9,7
25	0	0	19	81	19	3,5	10,5
50	0	0	15	79	21	3,5	10,7
50	50	0	4,8	83	17	3,5	10,8
			3,8	83	17	3,1	12,5
0	50	200	9,5	83	17	3,2	12,9
0	50	2000	4,0	82	18	3,1	13,2

Ba 4. Proizvodnja soka z obdelavo sadja in sočivja

Ugotovili smo, da so pripravki SPS-aze zelo primerni za proizvodnjo soka z obdelavo raznega sadja, jagodičja in sočivja, npr. korenja, graha, paradižnika, jabolk, hrušk, črnega ribeza, fižola in zelja. S tem dosežemo v primerjavi s tržno dosegljivimi pripravki pektinaze in celulaze boljši dobiček soka in boljšo ekstrakcijo barvilnih in aromatičnih sestavin.

PRIMER Ba 4.1

Sklicujemo se na primer Ba 3.1, kjer smo pripravek SPS-aze primerjali s tržno dosegljivima običajnima produktoma celulaze oz. pektinaze Celluclastom[®] 200 L in Pectinexom[®] 3x. Iz tabele je razvidno, da se da dobiček soka rahlo izboljšati že samo s 50 g/hl SPS-aze v primerjavi z 2000 g/hl Pectinexa[®], obakrat v kombinaciji s 50 g/hl Celluclasta[®]. Tudi viskoznost je bila malce nižja. Tako se zdi, da je SPS-aza okoli 40-krat učinkovitejša kot Pectinex.

Ba 5. Obdelava v zvezi z ekstrakcijo ali stiskanjem sladkornega trsa ali sladkorne pese

Ugotovili smo, da se da dobiček, ki se nanaša na preproste ekstrakcijske procese, izboljšati, če uporabimo pripravek SPS-aze za obdelavo sladkornega trsa ali sladkorne pese

pred in/ali med njuno ekstrakcijo ali stiskanjem. Tudi preostanek (bagaso) lahko obdelamo s pripravkom SPS-aze, s čimer se delno pretvori v fermentativne sladkorje, ki jih lahko uporabimo kot surovino za etanolno fermentacijo.

PRIMER Ba 5.1

10 kg preostanka sladkorne pese (pulpe), dobljenega iz kontinuirne protitočne ekstrakcije v DDS-difuzerju v Naskov Sugar Factory smo zmleli dvakrat v mlinu Fryma (tip MZ-110). Med operacijo mletja smo dodali procesno vodo.

Porcije po 300 g pulpe smo sedaj encimsko obdelovali pri 45°C 18 ur s pomočjo doz encima, prikazanih v tabeli Ba V. Suhi encimski produkt (KRF-68) smo dodali k pulpi, ki smo jo mešali v teku prve ure s palčko. Nato smo pulpo utekočinili do take mere, da smo nato lahko med preostalim časom uporabljali magnetno mešanje. Ob koncu presnove smo izmerili pH (med začetkom presnove nismo korigirali pH) in reakcijsko zmes centrifugirali, dokler nismo dobili bistrega supernatanta. V reakcijskih zmesih in v supernatantih smo izvedli določitev suhe snovi. Na osnovi teh rezultatov smo izračunali procente solubilizirane suhe snovi. Pri vseh računih smo izvršili korekture za topno suho snov encimskega produkta.

Supernatante št. 2, 3 in 4 smo ionsko izmenjali in s HPLC analizirali sestavo ogljikovih hidratov.

Tabela Ba V Rezultati, dobljeni z encimskim utekočinjenjem pulpe sladkorne pese

Poskus št.	Doza encima glede na suho snov E/S %	Končne meritve			
		Reakcijska zmes		Supernatanti	
		pH (končni)	% suhe snovi	% suhe snovi	% solubilizirane suhe ^e snovi
1	0	5,5	4,18	0,0	0,0
2	0,35	3,6	3,85	2,58	66,9
3	0,56	3,5	3,81	2,56	66,2
4	1,02	3,5	3,86	2,73	70,4
5	1,58	3,3	3,17	2,34	73,4
6	3,10	3,4	3,23	2,49	76,4
7	7,52	3,4	2,66	2,18	80,5

Reakcijski pogoji: M = 300 g

S = 4,18 % suhe snovi

E/S kot prikazano zgoraj

pH nismo uravnali

T = 45°C

t = 18 ur

Tabela Ba VI Podatki HPLC

Vrsta sladkorja (nevtralen)	Poskus št.		
	2	3	4
	% nevtralnih sladkorjev		
Visoko molekulski (DP4+)	43,6	31,9	25,3
Disaharidi	4,6	4,8	-
Glukoza	20,4	23,7	27,8
Galaktoza	5,0	5,9	7,3
Fruktoza/arabinoza	26,4	32,2	33,2
Galakturonska kislina	nismo merili		

Vse sladkorje, ki nastanejo v skladu z gornjo tabelo Ba VI, lahko fermentiramo v alkohol ali uporabimo za druge namene.

Ba 6. Proizvodnja sojinega mleka

Sojino mleko se da zlahka proizvesti s popolnim utekočinjenjem mlete soje in temu sledečo homogenizacijo nastale zmesi. Sojino mleko proizvajajo pogosto z namakanjem soje v vreli vodi, mletjem namočenega zrnja in ekstrakcijo z vodo, ki ji sledi ločenje netopnih ostankov, npr. proteinov

in polisaharidov. Da bi izboljšali dobitek sojinega mleka, lahko te netopne ostanke utekočinimo s presnovo z SPS-azo.

Primer Ba 6.1

Postopek za sojino mleko ponazarja sledeča serija encimskih presnov, pri čemer prikazujejo računi za indeks topnosti proteina (PSI, %) in indeks topnosti suhe snovi (DSI, %) dobitke, dosežene po ločenju pri pH = 7 (glej tabelo Ba VII). Encimske presnove smo izvedli pri sledečih pogojih:

Substrat: Polnomastna sojina moka (Dansk Sojakagefabri-
A/S)

Masa reakcijske zmesi: 220 g

Masa substrata: 20 g

Temperatura: 50 °C

pH: 4,5 (6 N HCl)

Reakcijski čas: Serija A : 1 uro

- - Serija B: 0,5 - 6 ur

Encim: SPS-aza (KRF-68)

Doza encima: Serija A: razmerje E/S (m/m):
0 - 8,0 %

Serija B: razmerje E/S (m/m):
1,0 %

Po presnovi smo uravnali pH s pomočjo 4 N NaOH na pH = 7 in izvedli ločenje s 15 minutnim centrifugiranjem pri 3000 x g.

Tabela Ba VII Izračun masne bilance v zvezi z encimskim postopkom za sojino mleko

Serija	Reakcijski čas	Doza encima E/S %	Reakcijska zmes		Supernatant	Indeksi topnosti		
			% proteina	% suhe snovi		PSI %	DSI %	
A	1,0	0	3,65	8,70	1,87	5,72	49,6	63,7
	1,0	0,5	3,68	8,74	2,41	6,28	63,7	70,0
	1,0	1,0	3,71	8,78	2,48	6,43	65,1	71,4
	1,0	2,0	3,78	8,86	2,98	7,18	77,5	79,5
	1,0	4,0	3,92	9,03	3,36	7,69	84,6	83,9
	1,0	8,0	4,19	9,37	3,76	8,09	88,5	85,0
B	0,5	1,0	3,64	8,78	2,39	6,41	64,0	71,1
	1,0	1,0	3,64	8,78	2,56	6,60	68,7	73,4
	2,0	1,0	3,63	8,78	2,79	6,91	75,2	77,1
	4,0	1,0	3,63	8,78	3,10	7,29	84,0	81,7
	6,0	1,0	3,63	8,78	3,39	7,69	92,3	86,5

Ba 7. Obdelava za povečanje količine topnih snovi v kavi, ki se dajo pridobiti.

Ugotovili smo, da ima obdelava kavnih zrn v različnih stopnjah proizvodnje kave za trenutno pripravo (instant coffee) za posledico povečan dobiček topnih snovi v kavi. Tako lahko npr. izrabljeno kavno usedlino ali zelena zrna encimsko obdelamo z ugodnimi rezultati.

Bb 1. Preprečenje in/ali razgradnja jabolčne ali hruškove motnosti

Po proizvodnji jabolčnega soka ali hruškovega soka in drugih sadnih sokov, ki morajo biti bistri in ki so bili, da bi preprečili nastanek motnosti, predhodno obdelani s konvencionalnimi pripravki pektinaze in celulaze, se lahko pojavi jabolčna motnost ali podobne sadne motnosti. Ugotovili smo, da so pripravki SPS-aze zelo primerni za razgradnjo takih motnosti, ki sestojе v glavnem iz arabana, vezanega na proteine.

Primer Bb 1

Ugotovili smo, da je koncentrat hruškovega soka, proizveden z utekočinjenjem odpadkov iz konserviranja hrušk ob uporabi Celluclasta[®] in Pectinexa[®], postal pri stanju moten. Motnost smo izolirali in hidrolizirali 24 ur z 0,01 N H₂SO₄ in analizirali s HPLC. Kromatogram je pokazal arabinozo in majhne količine oligosaharidov.

Ugotovili smo, da se je s 3-urnim inkubiranjem 0,5 % m/v tega ogljikovega hidrata v 1 mM acetatnem puferju pri pH 4,5 pri 40 °C z SPS-azo (KRF-68 + KRF-92 1:1) s koncentracijo encima 0,05 % m/v pretvorilo 84 % prvotnega ogljikovega hidrata motnosti (suha snov) v arabinozo.

Tudi razredčeni hruškov koncentrat (20 ° Brix) smo obdelovali 2 uri pri 40 °C z encimsko dozo 0,15 % m/v zgoraj navedene SPS-aze ali s tržnim produktom, imenovanim Clarex[®],

v dozi 1 % m/v. Ugotovili smo, da je bila SPS-aza sposobna zmanjšati relativno površino HPLC arabanu podobne motnosti za 86 %, medtem ko je znašalo ustrezno zmanjšanje s Clarexom[®] (ki smo ga uporabili v mnogo večji dozi kot pripravek SPS-aze) samo 78 %.

Bb 2. Uporaba kot bistrilno sredstvo za belo vino

Ugotovili smo, da se da bela vina, ki kažejo zelo nezaželeno motnost, učinkovito zbistriti s pomočjo SPS-aze; pokazalo se je, da sestoji motni material v glavnem iz arabinogalaktanov, ki so vezani za hidrokisiprolinske ostanke strukturnega proteina celičnih sten.

Bb 3. Proizvodnja ISSPH ali drugih rastlinskih proteinskih hidrolizatov

Pred ločenjem ISSPH (izoelektrično topni sojin proteinski hidrolizat) ali drugih rastlinskih proteinskih hidrolizatov od gošče, kot je opisano v patentu ZDA št. 4 100 024 ali v Process Biochemistry, vol. 14, No. 7 (1979), strani 6 do 8 in 10 do 11, lahko reakcijsko zmes obdelamo s pripravkom SPS-aze. S tem dosežemo lažje ločenje.

Bb 4. Encim za žontanje v pivovarništvu

Pri proizvodnji piva vplivajo ogljikovi hidrati v surovinah, npr. β -glukani v sladu in ječmenu, na viskoznost in filtrabilnost ječmenovke. Dodatek SPS-aze med žontanjem bo zmanjšal viskoznost ječmenovke in izboljšal filtrabilnost in dobiček ekstrakta. Razen tega bo dodatek SPS-aze med žontanjem povečal fermentativnost ječmenovke in delež dušika v ječmenovki.

Primer Bb 4.1

V laboratoriju smo žontali 50 g mletega zdroba, ki sestoji iz 50 % slada in 50 % ječmena, skupaj z 275 g vode (15 % suhe snovi) v skladu s sledečim diagramom žontanja: 52 °C (60 minut)/63 °C (60 minut)/76 °C (30 minut).

Da bi dokazali učinek SPS-aze, smo izvedli 4 teste, glej spodaj navedeno tabelo, pri čemer smo encime dodali med žontanjem (pH žonte 5,5 do 6,0).

Encim	Nič	Cereflo	SPS-aza (KRF 68)	
Aktivnost beta-glukanaze/g	0	200 BGU	1630 FBG	1630 FBG
Doza encima na kg zdroba	0	1,5 g	0,05 g	0,18 g
Celotna doza enot encimske aktivnosti na kg zdroba	0	300 BGU	80 FBG	300 FBG
Hitrost filtracije ječmenovke po 10 minutah	120 ml	135 ml	160 ml	170 ml
Viskoznost ječmenovke 10° Balling (25 °C)	$1,25 \cdot 10^{-3}$ Pa.s.	$1,36 \cdot 10^{-3}$ Pa.s.	$1,36 \cdot 10^{-3}$ Pa.s.	$1,30 \cdot 10^{-3}$ Pa.s.

BGU so enote beta-glukanaze, določene v skladu z analitsko metodo AF 70/4-GB, ki se da dobiti pri NOVO Industri A/S.

FBG so enote fungalne beta-glukanaze, določene v skladu z analitsko metodo AF 70.1/2-GB, ki se da dobiti pri NOVO Industri A/S.

Edina razlika med BGU in FBG je pH, pri katerem izvedeno encimsko določitev: pH 7,5 za BGU in pH 5,0 za FBG.

Cereflo je pripravek bakterijske beta-glukanaze, opisan v informativnem prospektu B 214b-GB 1500, julij, ki se ga da dobiti pri NOVO Industri A/S.

Primer Bb 4.2

V laboratoriju smo žontali 50 g mletega zdroba, ki sestoji iz 40 % slada in 60 % ječmena, skupaj s 150 g vode (25 % suhe snovi) v skladu s sledečim diagramom žontanja: 45 °C (60 minut)/63 °C (90 minut)/75 °C (15 minut). Da bi dokazali učinek SPS-aze, smo izvedli tri teste, glej spodaj navedeno tabelo, pri čemer smo encime dodali med žontanjem (pH žonte 5,5 do 6,0).

Encim	Nič	Ceremix	SPS-aza (KRF 68) + Ceremix, dodano kot v prejšnjem testu
Aktivnost beta-glukanaze/g	-	200 BGU	1630 FBG
Doza encima na kg zdroba	-	1,65 g	0,033 g
Celotna doza enot encimske aktivnosti na kg zdroba	0	330 BGU	50 FBG
Hitrost filtracije ječmenovke po 30 minutah	48 ml	98 ml	111 ml
Ekstrakt, °Balling	18,6	19,0	19,5
Viskoznost ječmenovke 10° Balling (25 °C)	1,72.10 ⁻³ Pa.S.	1,37.10 ⁻³ Pa.s.	1,27.10 ⁻³ Pa.s.

Definicija BGU in FBG je navedena v primeru Bb 4.1.

V zadnjem stolpcu gornje tabele sta navedeni samo aktivnost in doza, ki izvirata iz SPS-aze.

Ceremix je pripravek bakterijske beta-glukanaze, opisan v informativnem prospektu B 216 b-GB 1000, Feb. 1982, ki se ga da dobiti pri NOVO Industri A/S.

Bb 5. Encimski dodatek za uporabo med fermentacijo in/ali skladiščenjem piva

SPS-azo lahko dodamo med fermentacijo ječmenovke ali skladiščenjem piva, da zmanjšamo delež β -glukanov in s tem izboljšamo filtracijo piva in obstojnost piva glede motnosti. SPS-aza bo imela učinek tudi na proteine, ki so odgovorni za motnost pri ohladitvi.

Bb 6. Sredstvo za luščenje mandljev

Med stopnjo mehanskega luščenja mandljev, ki sledi blanširanju mandljev, se določen odstotek mandljevih luščin ne odlušči. Ugotovili smo, da ima encimska obdelava mandljev za posledico zmanjšanje zgoraj omenjenega odstotka.

Bc 1. Razgradnja različnih odpadnih materialov

V zvezi z določenimi proizvodnimi procesi se tvorijo velike količine odpadnih materialov, ki vsebujejo ogljikove hidrate. Tako je npr. v zvezi s proizvodnjo sojinega izolata z ekstrakcijo z vodo in obarjanjem s kislino, sojinim mlekom in tofu-jem (posebna vrsta japonskega sira). V tej zvezi lahko omenimo tudi odpadne pulpe npr. jabolk, hrušk ali citrusov. Ugotovili smo, da je pripravek SPS-aze sposoben, da

popolnoma utekočini ta odpadni material, ki vsebuje ogljikove hidrate, in da proizvede fermentativne sladkorje, ki jih lahko uporabimo kot izhodni material za etanolno fermentacijo.

Primer Bc 1.1

Pri tradicionalni proizvodnji sojinega mleka ali tofu-ja pogosto namakajo sojo v vreli vodi, jo zmeljejo in ekstrahirajo z vročo vodo, nakar izvedejo ločenje. Ostanek iz tega ločenja je material, ki ga uporabljamo za ta poskus. Tekoča faza je sojino mleko, ki ga lahko dalje obdelamo, da dobimo tofu.

10 kg celih sojinih zrn, dobljenih od Aarhus Oliefabrik A/S, smo mleli istočasno s 70 l vrele vode v mlinu Fryma, tip MZ 110. Zmleto goščo smo nato vzdrževali 15 minut nad 85 °C, da smo inaktivirali naravne sojine encime, ki razvijajo znano slabo aromo soje. 5 l te sojine gošče smo nato centrifugirali v laboratoriju 15 minut pri 3000 x g (g = težnost). Z analizo smo ugotovili, da je preostanek vseboval 20,45 % in 20,06 % suhe snovi (dvakratno določevanje, izračunano povprečje 20,26 %). Počasi smo dodali 6 N HCl in jo z lopatico vdělali v preostanek, dokler pH - meter ni pokazal 4,50, če smo vtaknili elektrodo direktno v maso.

Encimske presnove smo izvedli na 2 x 200 g mase z dvema dozama SPS-aze (KRF-68) E/S = 0,5 % glede na suho snov oz. E/S = 3,0 % glede na suho snov, v 500 ml čaši pri 50 °C. Masi smo dodali suhi encim. V teku prvih 1 do 2 ur smo izvajali mešanje z lopatico, nato pa je bila masa utekočinjena do take mere, da smo nato lahko uspešno izvajali mešanje z magnetom. Celotni reakcijski čas je bil 21 ur.

Med reakcijo smo merili osmolalnost z osmometrom (Advanced Digimatic 3DII, firme Advanced Instruments Inc.). Rezultati v tabeli BcI kažejo potek presnove. Na koncu poskusa smo zmesi centrifugirali 15 minut pri 3000 x g. Na površini supernatanta se je pojavil sloj olja in njegov volumen smo določili. Kot sloj na dnu se je pojavil rahel sloj gošče. Supernatant smo vključno z oljem odstranili s pipeto. Olje smo s homogeniziranjem združili z bistro vodno fazo in odvzeli vzorec za določevanje suhe snovi. Rezultati, prikazani v tabeli Bc I, jasno dokazujejo, da se da z encimsko presnovo ta odpadni produkt utekočiniti in da lahko proizvedemo surovo olje, kot smo omenili v poglavju A 4. Po pridobivanju olja lahko solubilizirani preostanek uporabimo na različne načine, npr. za fermentacijo v dragocene spojine ali za koncentriranje in sušenje in temu sledečo uporabo kot krmo ali prehranski produkt ali pa po dodatnem čiščenju za proizvodnjo dragocenih produktov.

Tabela Bc I. Rezultati, dobljeni med utekočinjenjem sojinega mleka in tofu-gošče

Reakcijski pogoji in rezultati	Poskus A			Poskus B		
Masa preostanka	200 g			200 g		
Masa SPS-aze (KRF-68)	0,20 g			1,20 g		
Temperatura	50 °C			50 °C		
pH	4,50			4,50		
Reakcijski čas	21 ur			21 ur		
Rezultati, izmerjeni na osmometru v teku presnove	t min.	osmolalnost mOsm	Δ osmolalnosti mOsm	t min.	osmolalnost mOsm	Δ osmolalnosti mOsm
	0	287	0	0	282	0
	10	313	26	10	368	86
Δ osmolalnosti je vrednost, korigirana za osmolalnost zmesi pri t = 0	-	-	-	25	497	215
	40	391	104	45	601	319
	95	501	214	95	718	436
	250	634	347	250	875	593
	1260	907	620	1260	1145	863
Reakcijska zmes: Suha snov	20,3 %			20,7 %		
Supernatant: Suha snov	18,0 %			19,4 %		
Supernatant: Delež olja	8 - 10 %			8 - 10 %		
Računski % solubilizirane suhe snovi	88,6 %			93,5 %		

Bc 2. Saharifikacija in istočasna fermentacija
Rastlinske materiale, ki vsebujejo ogljikove hidrate, npr. gomoljnice, kot laško repo, krompir, sladki krompir, manjok ali pulpo takih gomoljnic, t.j. material, ki preostane po odstranjenju ekstrahiranih sestavin, lahko saharificiramo z obdelavo s pripravkom SPS-aze, in istočasno lahko nastale fermentativne saharide fermentiramo v etanol.

Primer Bc 2.1

V laboratorijskem merilu smo preučili proizvodnjo etanola s fermentacijo razgrajene laške repe, ki vsebuje inulin, z istočasno saharifikacijo z SPS-azo in inulinazo in s štirimi različnimi predhodnimi obdelavami laške repe.

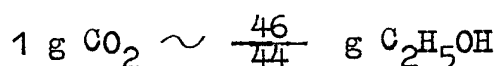
SPS-aza : Uporabili smo pripravek SPS-aze KRF-68.

Inulinaza: Inulinazo smo proizvedli s fermentacijo *Asp. ficuum* (CBS 55 565). Aktivnost inulinaze smo določili, kot je opisano v Research Disclosure No. 21234 (december 1981) strani 456 do 458.

Laboratorijska fermentacija: 150 g porcije predhodno obdelane žonte (opisane kasneje) smo fermentirali po dodatku 4,5 g pekovskega kvasa in 1 ml 4 %-ne raztopine Pluronica kot protipenilnega sredstva. Fermentacijske buče smo opremili s pastmi za CO₂, ki so vsebovale 98 %-no žveplovo kislino, in fermentacijo smo spremljali z merjenjem izgube teže zaradi sproščenega CO₂. Vsebino buč smo med fermentacijo, ki smo jo izvedli pri

30 °C, mešali. Za vsak parameter, ki smo ga preučevali, smo uporabili po tri buče.

V tabeli Bc II je izguba teže zaradi sproščenega CO₂ pretvorjena v etanol ob domnevi, da je 1 mol sproščenega CO₂ ekvivalenten molu C₂H₅OH, t.j.



Predhodne obdelave repe:

Obdelava A: 14,1 kg repe (22,8 % suhe snovi) smo kuhali v Henzejevem kotlu pri 140 °C in 4 do 5 bar 20 minut. Teža po kuhanju je bila 19,0 kg (~ 16,9 % suhe snovi). Fermentacije smo izvedli direktno na žonti.

Obdelava B: Oprano in zrezano repo smo zmešali z vodo (1:1) in nato mešali v Waringovem mešalniku. Žonto smo nato toplotno obdelovali 1 uro pri 85 °C in pH = 4,

Obdelava C: Kot B, vendar pH nismo uravnavali.

Obdelava D: Kot B, vendar brez toplotne obdelave in uravnavanja pH.

Rezultati: V tabeli Bc II kažejo rezultati učinek dodatka SPS-aze k predhodno obdelani žonti na dobitok etanola. Signifikantno izboljšanje dobitka etanola smo dosegli pri vseh predhodno obdelanih žontah, če smo dodali SPS-azo.

Tabela Bc II Rezultati fermentacije v primerjavi z istočasno fermentacijo in encimsko saharifikacijo laške repe

Predhodna obdelava	Enote inulinaze, dodane k 1 g suhe snovi	SPS-aza E/S %	Izguba CO ₂ (g) po 42 - 44 urah fermentacije	% proizvedenega etanola, glede na suho snov
A	1,5	0	7,65 ± 0,05	31,5
	1,5	0,27	8,07 ± 0,08	33,2
B	1,5	0	4,85 ± 0,03	29,7
	1,5	0,40	5,41 ± 0,03	33,1
C	1,5	0	5,70 ± 0,05	34,8
	1,5	0,10	5,97 ± 0,01	36,5
	1,5	0,20	6,13 ± 0,06	37,5
	1,5	0,30	6,13 ± 0,00	37,5
	1,5	0,40	6,18 ± 0,05	37,8
D	1,5	0	5,77 ± 0,02	35,3
	1,5	0,10	5,89 ± 0,00	36,0
	1,5	0,20	6,04 ± 0,11	36,9
	1,5	0,30	6,01 ± 0,01	36,7
	1,5	0,40	6,02 ± 0,03	36,8
	0	0,40	5,48 ± 0,02	33,5

Bc 3. Razgradnja celuloze.

Ugotovili smo, da lahko materiale, ki vsebujejo celulozo, kot npr. slamo, npr. slamo žitaric, žagovino, papir in lignocelulozo, hidroliziramo s pripravkom SPS-aze v večji meri kot s konvencionalnimi celulazami. To prikazuje sledeči primer, v katerem obdelamo kristaliničen celulozni material (AVICEL) s pomočjo konvencionalne celulaze Celluclast[®] 200, ki jo proizvaja *Trichoderma reesei*, in pripravka SPS-aze KRF 68.

Primer Bc 3.1

Avicel smo suspendirali v vodi (20 % suhe snovi); pH smo uravnali na 5 in temperaturo vzdrževali pri 50 °C. Po reakcijskem času 24 ur smo goščo filtrirali in izmerili delež redukativnega sladkorja (mg glukoze/g AVICELA). Pri uporabi doz encima, ki so znašale 5 % in 20 % deleža celuloze, smo ugotovili sledeče vrednosti:

Tabela Bc III

Encim	E/S %	mg glukoze/g AVICELA
Celluclast	5	80
SPS-aza	5	200
Celluclast	20	100
SPS-aza	20	340

Bc 4. Uporaba kot pripomoček pri peki

Ugotovili smo, da so pripravki SPS-aze izvrstno primerni kot pripomočki pri peki. Če torej dodamo suhi moki

pred pripravo testa pripravkov SPS-aze, lahko dobimo kruh boljše kvalitete glede volumna, sredice in okusa. Tako lahko dobimo zelo kvaliteten kruh s pšenično moko slabše kvalitete, če uporabimo kot dodatek pripravkov SPS-aze.

Bc 5. Izboljšanje dobitka alkohola in dobitka biomase med fermentacijo sulfitne odpadne lužnice iz proizvodnje papirja

Ugotovili smo tudi, da lahko dobiček etanola izboljšamo, če papirniško sulfitno odpadno lužnico obdelamo s pripravkom SPS-aze, predno jo uporabimo kot vir ogljikovih hidratov za fermentacijo etanola. Papirniško odpadno sulfitno lužnico lahko uporabimo tudi za proizvodnjo biomase, npr. enoceličnega proteina, s fermentacijo, in tudi v tem primeru smo dobiček biomase izboljšali, če smo sulfitno lužnico predhodno obdelali s pripravkom SPS-aze. Razgradnjo v prisotnosti pripravka SPS-aze in fermentacijo lahko izvedemo tudi istočasno.

Bc 6. Odstranjevanje vode iz bioloških muljastih produktov.

Med tradicionalno vodno ekstrakcijo mnogih bioloških materialov iz rastlinskih surovin se tvorijo veliki volumni netopnega ostanka, ki sestoji iz velikih deležev nabreknjenih polisaharidov. Tako je npr. pri proizvodnji sojinega mleka,

tofuja ali sojinega izolata z vodno ekstrakcijo soje, razmaščene sojine moke ali belih kosmičev. Strukturni nabreknjeni polisaharidni material lahko nato obdelamo v rahli meri z SPS-azo, s čimer se mrežna struktura materiala odpre in se solubilizirajo samo majhne količine ogljikovih hidratov. S tem odvezujemo materialu vodo in zato dosežemo v gošči večji delež suhe snovi v primerjavi s produktom, dobljenim brez encimske obdelave. Tako kaže encimski postopek prednost znatno manjše porabe energije za odstranjenje vode s sušenjem, in odpira tudi možnost proizvodnje cenejšega suhega materiala za živalsko krmo ali polnila za živilske uporabe.

Bc 7. Pripomoček za siliranje

Znano je, da zaradi povečanja hitrosti silažnega procesa in prebavljivost silaže dodajajo k silaži encimske pripomočke za siliranje. Ugotovili smo, da pripravki SPS-aze prekašajo znane encimske pripomočke za siliranje.

Pregled slik, na katere smo se že sklicevali, navajamo spodaj z namenom, da bi zagotovili bolj izčrpen pregled.

Slika št.	Spada k	Opisuje
1	splošnemu delu opisa	dokaz vezivnega učinka med SPS in sojinim proteinom
2	splošnemu delu opisa	tehnološko shemo, ki opisuje pripravo SPS
3	poglavju 2	kalibracijsko krivuljo za HPLC kromatografijo gelske filtracije
4	poglavju 2	HPLC kromatogram gelske filtracije SPS
5	poglavju 2	HPLC kromatogram gelske filtracije SPS, razgrajenega z SPS-azo
6	poglavju 2 in 3	HPLC kromatogram gelske filtracije supernatanta iz SPS, inkubiranega s sojinim proteinom
7	poglavju 2	HPLC kromatogram gelske filtracije supernatanta iz razgrajenega SPS, inkubiranega s sojinim proteinom
8	poglavju 3	HPLC kromatogram gelske filtracije APS, razgrajenega s Pectolyaso
9	poglavju 3	HPLC kromatogram gelske filtracije APS, razgrajenega z SPS-azo
10	poglavju 3	HPLC kromatogram gelske filtracije SPS, obdelanega s Pectolyaso

Slika števil.	Spada k	Opisuje
11	poglavju 7	imunoelektroforetične pike, vključno pik SPS-aze, identificiran s prekrivno tehniko
12	poglavju 8	kromatogram ionske izmenjave SPS-aze
13	poglavju 9	odvisnost aktivnosti SPS-aze od pH
14	poglavju 9	odvisnost aktivnosti SPS-aze od temperature
15	poglavju 9	temperaturno stabilnost SPS-aze
16	poglavju 10	pH-stabilnost proteaze v pripravku SPS-aze

PATENTNI ZAHTEVKI

1. SPS-aza, karbohidraza v uporabni obliki, ki je sposobna, da razgradi pod primernimi pogoji sojin SPS v razgradne produkte, ki se vežejo na protein v vodnem mediju v manjši meri, kot bi se sojin SPS pred razgradnjo vezal sam na isti protein pod ustreznimi pogoji.

2. SPS-aza po zahtevku 1, označena s tem, da je SPS-aza sposobna, da razgradi sojin SPS v vodnem mediju v razgradne produkte, ki se vežejo na rastlinski protein v vodnem mediju v manjši meri, kot bi se sojin SPS pred razgradnjo vezal sam na isti rastlinski protein v vodnem mediju.

3. SPS-aza po zahtevku 1 ali 2, označena s tem, da je SPS-aza sposobna, da razgradi sojin SPS v vodnem mediju s pH vrednostjo, ki od 4,5 ne odstopa za več kot 1,5, v razgradne produkte, ki se vežejo na sojin protein v vodnem mediju v manjši meri, kot bi se sojin SPS pred razgradnjo vezal sam na sojin protein v vodnem mediju.

4. SPS-aza po zahtevku 1 do 3, označena s tem, da se razgradni produkti sojinega SPS po končani razgradnji vežejo na rastlinski protein v obsegu manj kot 50 %, zlasti manj kot 20 %, kot bi se sojin SPS pred razgradnjo vezal na rastlinski protein v vodnem mediju.

5. SPS-aza po zahtevku 1 do 4, označena s tem, da kaže SPS-aza pozitiven test na SPS-azo, če jo preiskujemo v skladu z metodo za kvalitativno in kvantitativno določevanje SPS-aze.

6. SPS-aza po zahtevku 1 do 5, označena s tem, da smo SPS-azo proizvedli s pomočjo mikroorganizma, ki spada v rod *Aspergillus*, prednostno v skupino *Aspergillus niger*.

7. SPS-aza po zahtevku 1 do 6, označena s tem, da je SPS-aza izvedena iz encimov, ki se jih da proizvesti z *Asp. aculeatus* CBS 101.43.

8. SPS-aza po zahtevku 1 do 7, označena s tem, da je SPS-aza imunoelektroforetično identična SPS-azi, ki se jo da proizvesti s pomočjo *Asp. aculeatus* CBS 101.43, in identificirati s pomočjo imunoelektroforetične prekrivne tehnike.

9. Izolirani SPS, označen s tem, da je izolirani SPS proizveden na osnovi rastlinskega surovega proteina kot surovine.

10. Izoliran SPS po zahtevku 8, označen s tem, da je rastlinski surovi protein razmaščena sojina moka.

11. Postopek za izbiro mikroorganizma, ki proizvaja SPS-azo, za proizvodnjo SPS-aze po zahtevku 1 do 8, označen s tem, da mikroorganizem, ki ga hočemo testirati, gojimo na gojišču, katerega glavni vir ogljika je SPS po zahtevku 9 ali 10

nakar vzorec gojišča analiziramo na SPS-azo in, če je analiza na SPS-azo pozitivna, omenjeni mikroorganizem izberemo kot mikroorganizem, ki proizvaja SPS-azo.

12. Postopek za proizvodnjo SPS-aze po zahtevku 1 do 8, označen s tem, da sev, ki se ga da izbrati v skladu s postopkom za izbiro po zahtevku 11, gojimo na gojišču.

13. Postopek po zahtevku 12, označen s tem, da gojimo na gojišču sev *Asp. aculeatus* QBS 101.43 ali *Asp. japonicus* IFO 4408.

14. Postopek po zahtevku 12 ali 13, označen s tem, da izvedemo gojenje kot submerzno gojenje pri pH v območju od 3 do 7, prednostno od 4 do 6, pri temperaturi v območju od 20 do 40 °C, prednostno od 25 do 35 °C, pri čemer vsebuje gojišče vire ogljika in dušika in anorganske soli.

15. Postopek po zahtevku 12 do 14, označen s tem, da vsebuje gojišče sojino moko.

16. Postopek po zahtevku 15, označen s tem, da obdelamo sojino moko, prednostno uporabimo kot sestavino substrata, s proteolitskim encimom, prednostno s proteolitskim encimom, proizvedenim mikrobno s pomočjo *Bacillus licheniformis*.

17. Postopek po zahtevku 12 do 16, označen s tem, da fermentacijski brozgi med gojenjem aseptično dodamo sterilno raztopino pektina.

18. Postopek za razgradnjo polisaharidov, prednostno polisaharidov rastlinskih celičnih sten, s pomočjo karbohidraze, označen s tem, da spravimo pripravek SPS-aze po zahtevku 1 do 8 v vodnem mediju v stik s substratom za

ta pripravek SPS-aze.

19. Postopek za razgradnjo polisaharidov po zahtevku 18, označen s tem, da spremlja razgradnjo izolacija ali ekstrakcija biološkega materiala, ki ni sojin protein in sorodni rastlinski proteini iz surovega biološkega materiala, pri čemer pripravek SPS-aze ne vsebuje v bistvu nobenega encima, ki je sposoben, da razgradi ta biološki material.

20. Postopek za razgradnjo polisaharidov po zahtevku 18 ali 19, označen s tem, da nadalje obdelamo enega ali več reakcijskih produktov (neglede na to, ali so zaželeni končni produkti ali odpadni produkti) istočasno z encimsko obdelavo ali po njej.

21. Postopek za razgradnjo polisaharidov po zahtevku 20, označen s tem, da je nadaljnja obdelava v primeru, da je eden od reakcijskih produktov fermentabilen sladkor, alkoholna fermentacija.

Za

NOVO INDUSTRI A/S:

25. 11. 92

P o v z e t e k

Izboljšave pri encimu za razgradnjo visokomolekulskega ogljikovega hidrata in v zvezi z njim, izolirani visokomolekulski ogljikov hidrat, postopek za izbiro mikroorganizma, ki proizvaja tak encim, in postopek za proizvodnjo takega encima.

Encim, ki je sposoben, da razgradi visokomolekulski ogljikov hidrat, skrajšano SPS (soluble polysaccharide), imenujemo SPS-aza. SPS-aza je sposobna, da razgradi SPS v razgradne produkte, ki se vežejo na protein v vodnem mediju v manjši meri, kot SPS pred razgradnjo. Postopek za izbiro mikroorganizma, ki proizvaja SPS-azo, temelji na dejstvu, da je SPS glavni vir ogljika gojišča, in na kvalitativnem testu na ploščo z SPS-agarjem. Opisan je postopek za proizvodnjo SPS-aze s pomočjo deponiranega seva *Asp. aculeatus*. SPS-aza je tudi uporabna v industriji sadja in zelenjave in za proizvodnjo sokov in vina.

25. 11. 92

NOVO INDUSTRI A/S

"Izboljšave pri encimu za razgradnjo visokomolekulskega ogljikovega hidrata.."

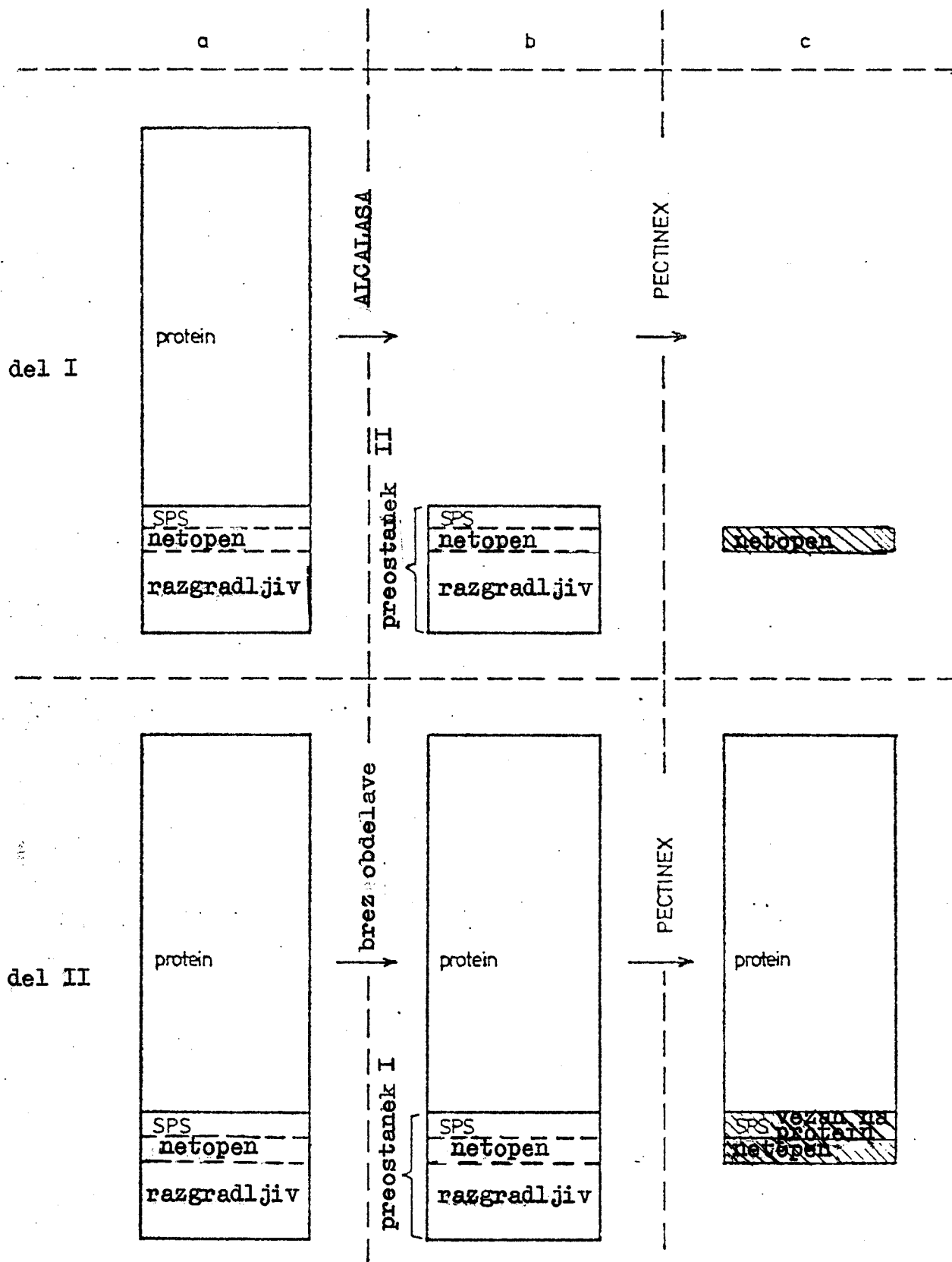


FIG. 1.

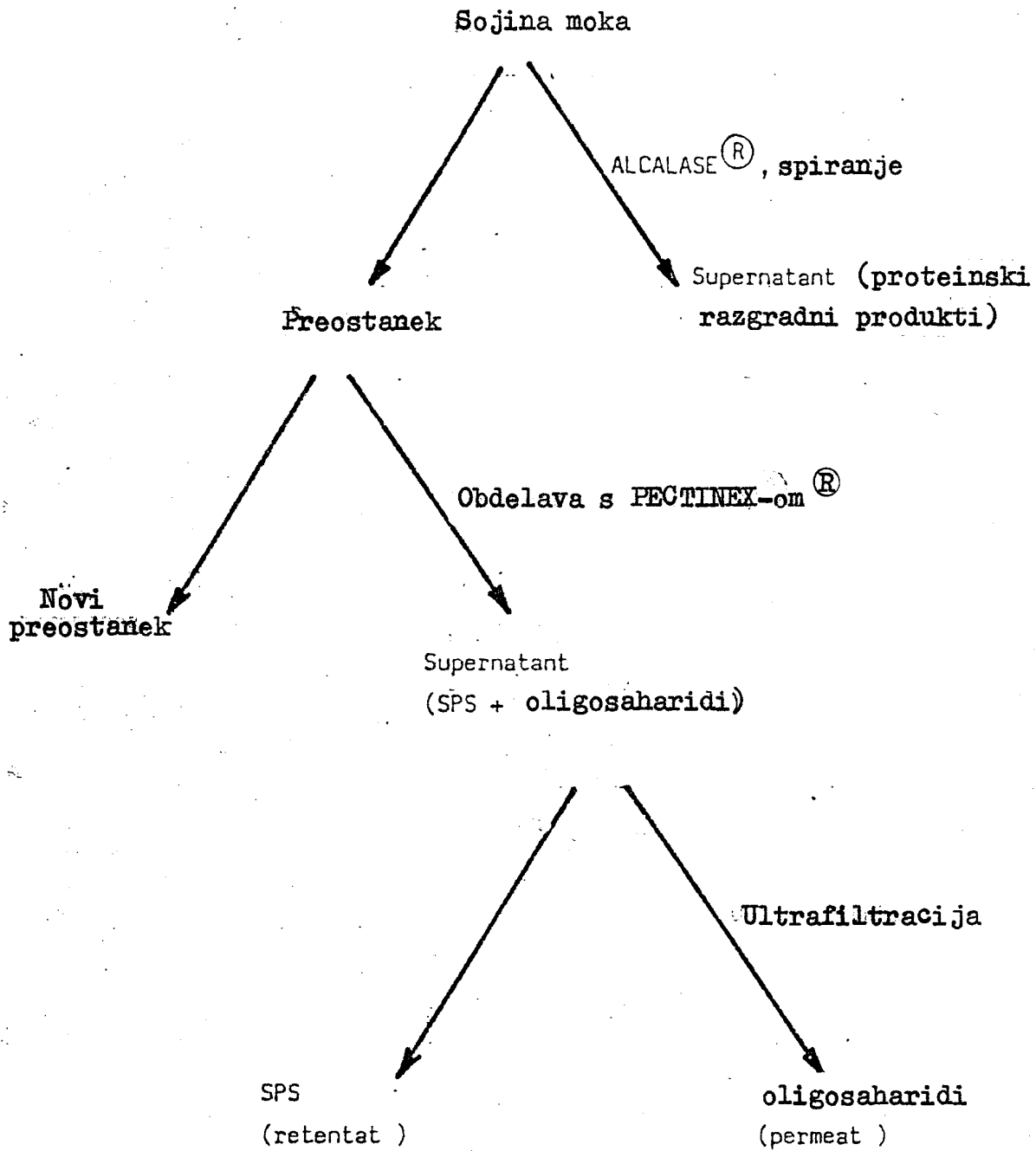


FIG. 2

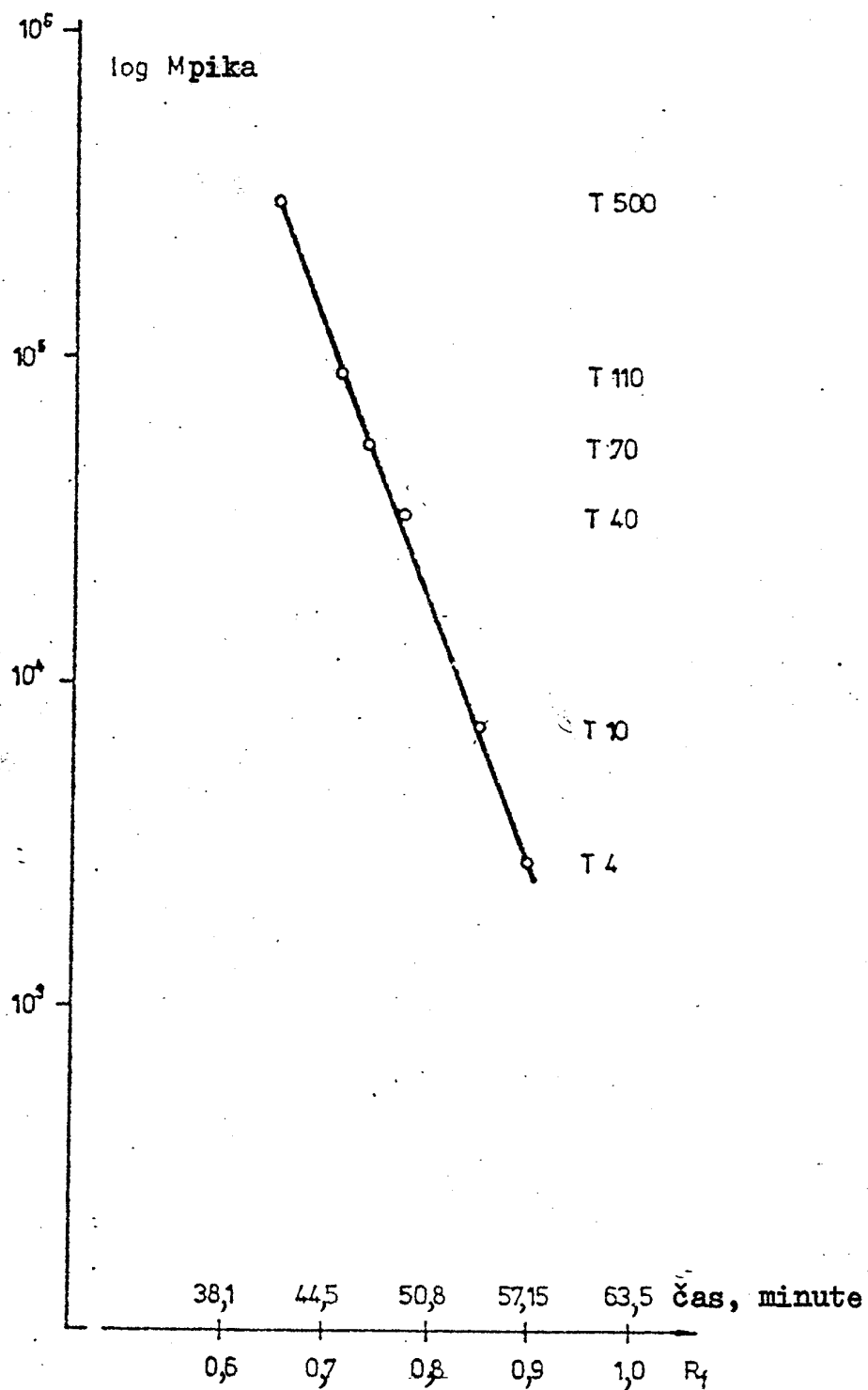


FIG. 3

FIG. 4



FIG. 5

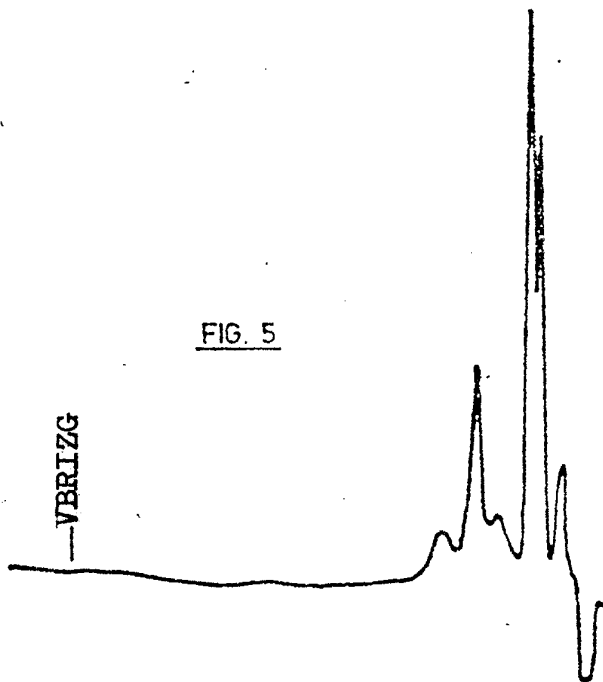
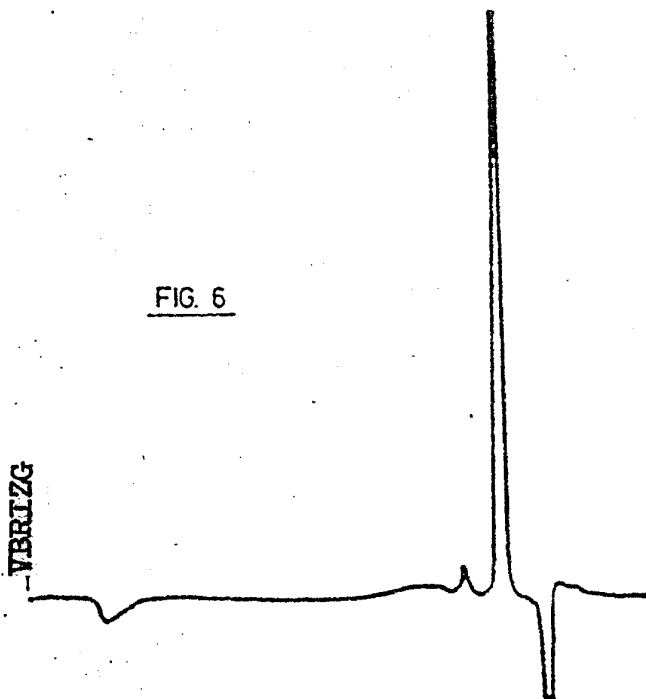


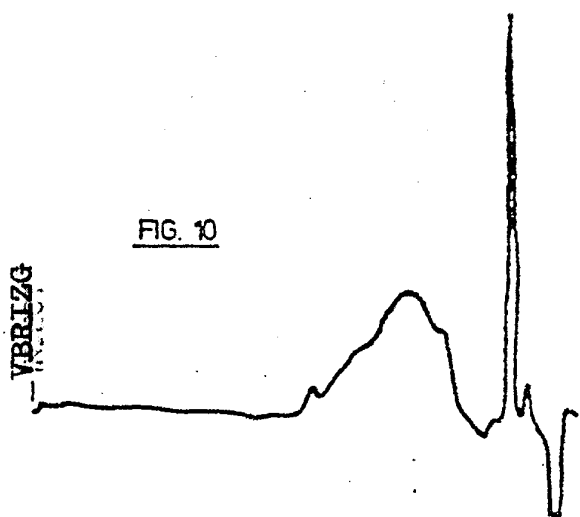
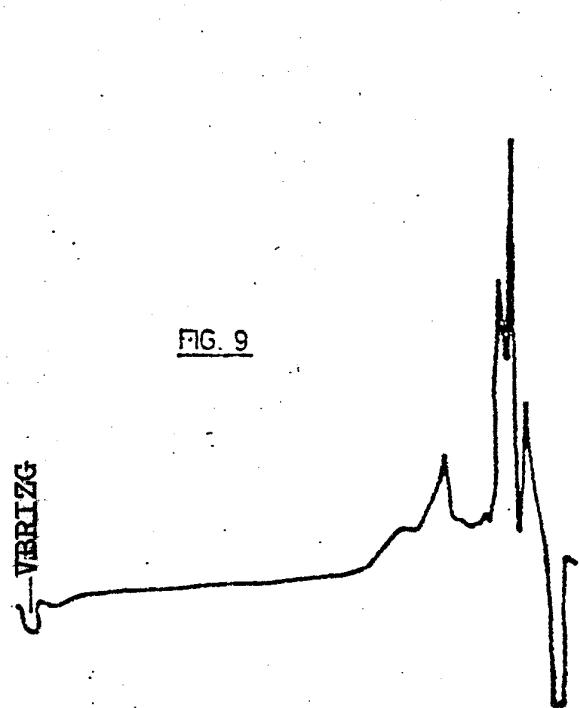
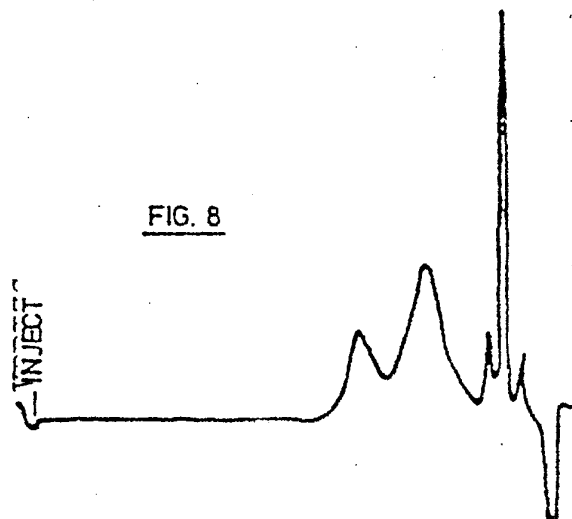
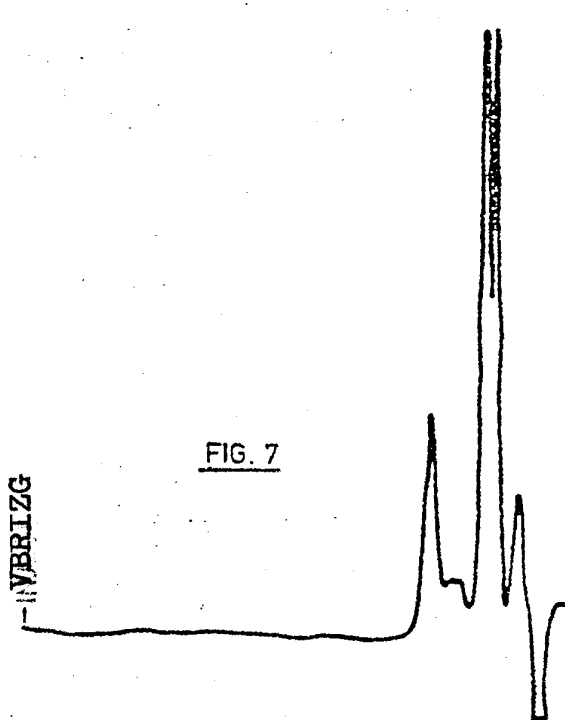
FIG. 6



27. 11. 92

NOVO INDUSTRI A/S

"Izboljšave pri encimu za razgradnjo visokomolekulskega ogljikovega hidrata..."



NOVO INDUSTRI A/S

"Izboljšave pri encimu za razgradnjo visokomolekulskega ogljikovega hidrata..."

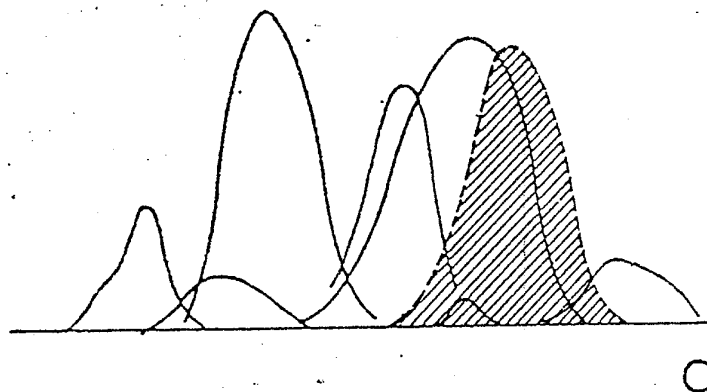
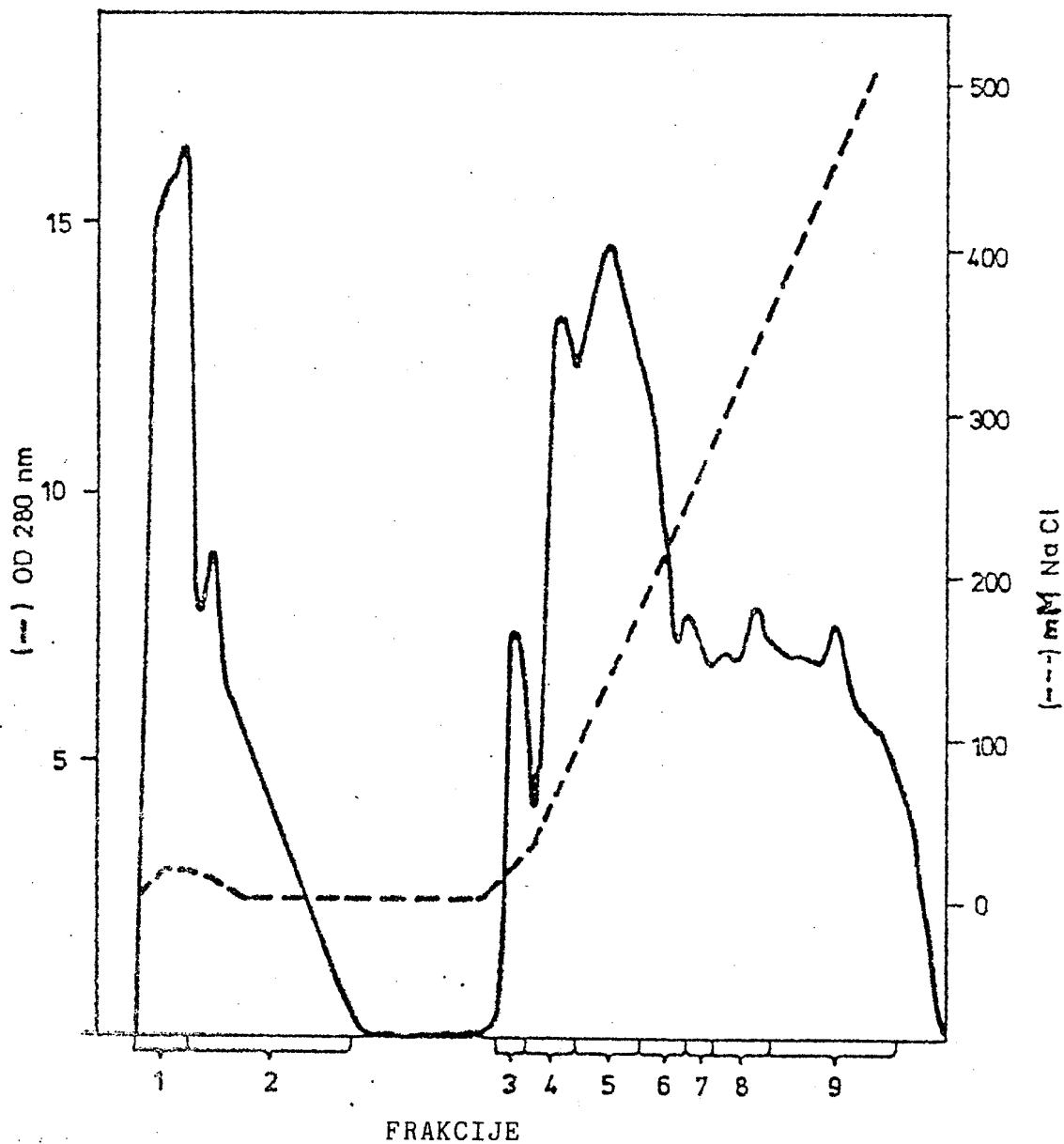


FIG. 11

FIG.12



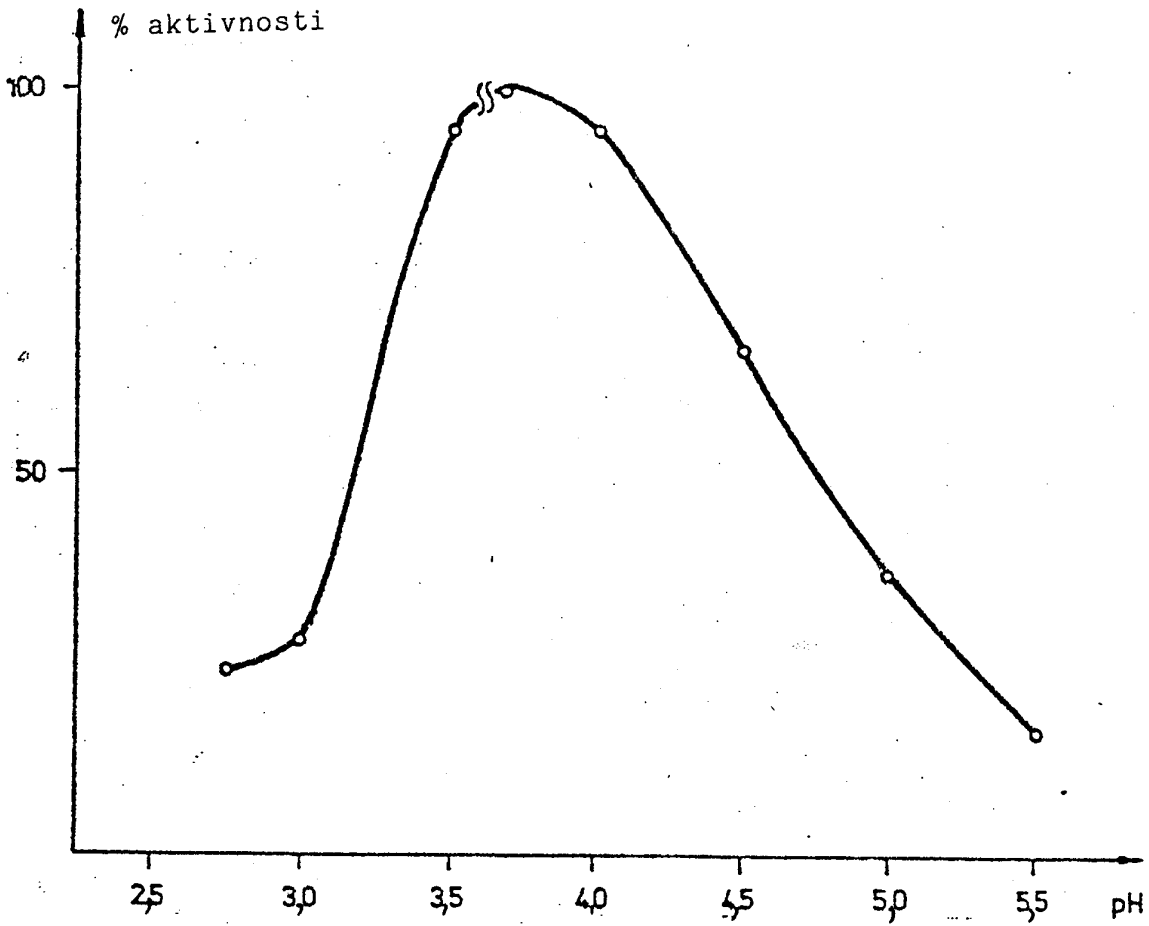
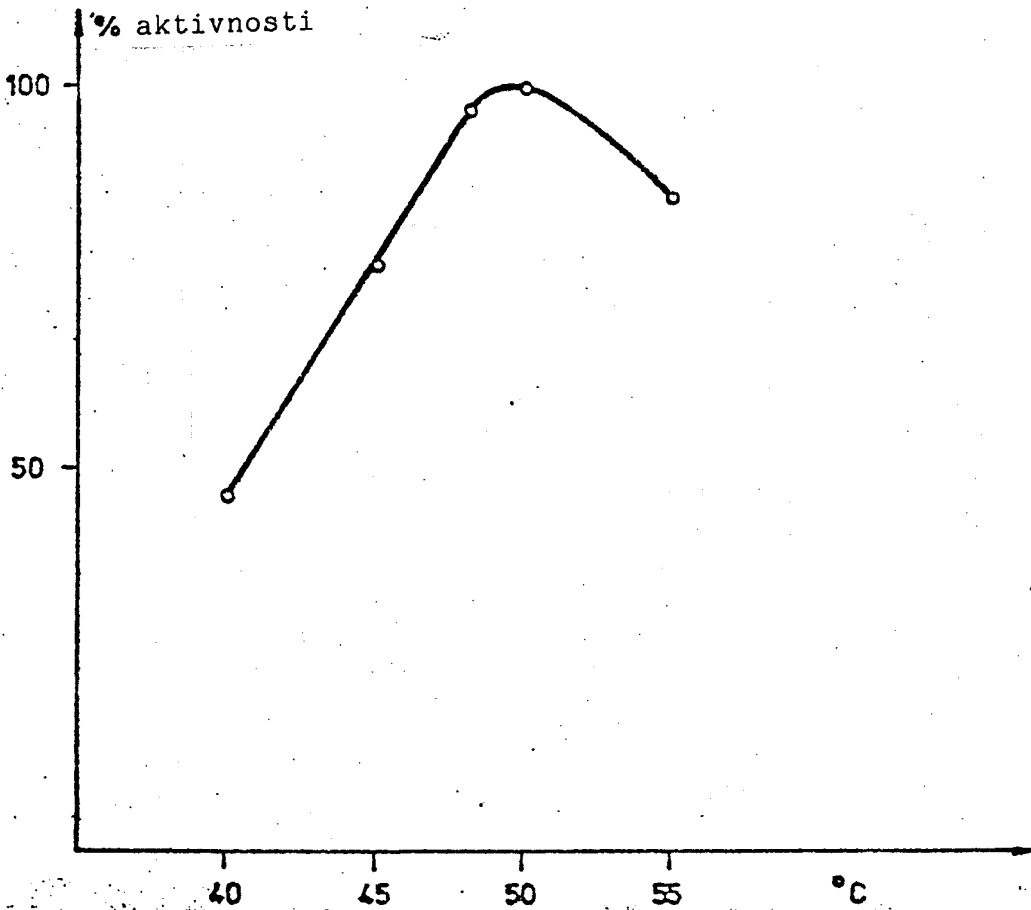


FIG. 13



25. 11. 92

NOVO INDUSTRI A/S

"Izboljšave pri encimu za razgradnjo visokomolekulskega ogljikovega hidrata..."

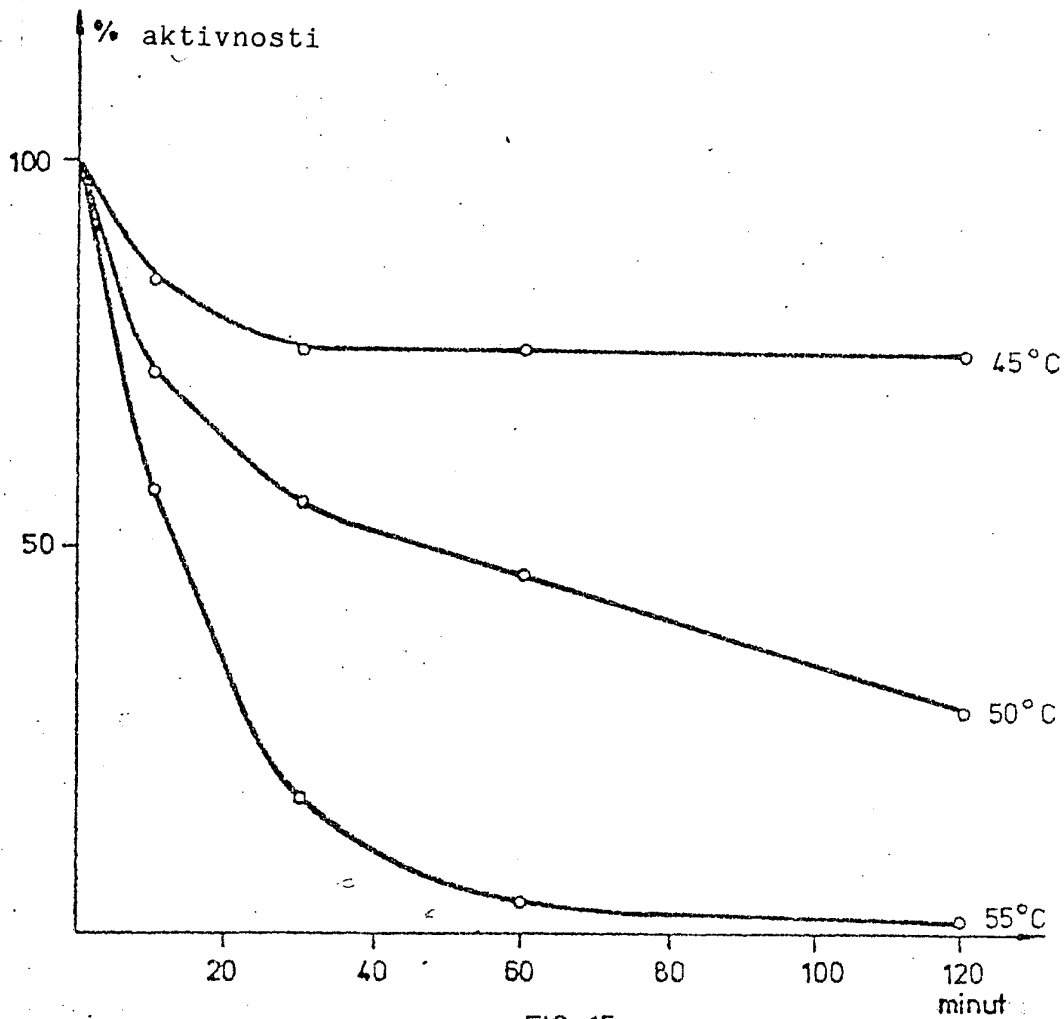


FIG. 15

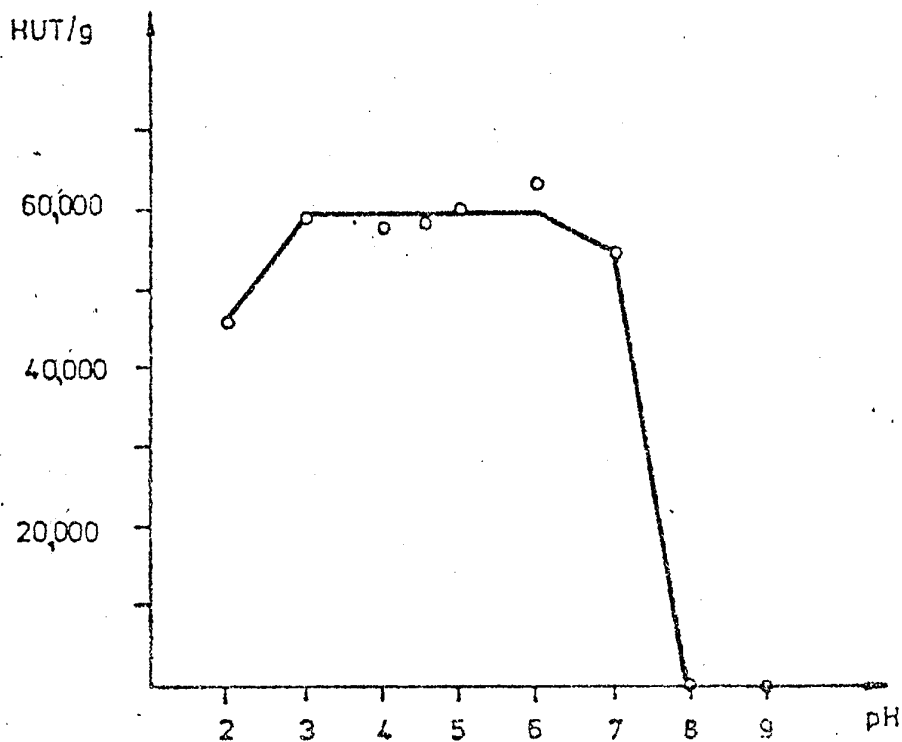


FIG. 15